

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-318467

(43)公開日 平成11年(1999)11月24日

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>

C 12 N 15/09  
A 61 K 48/00

識別記号

ZNA  
ADS

F I

C 12 N 15/00  
A 61 K 48/00

ZNAA  
ADS

審査請求 未請求 請求項の数15 FD (全 44 頁)

(21)出願番号 特願平10-142134

(22)出願日 平成10年(1998)5月8日

特許法第30条第1項適用申請有り 1998年1月19日～1  
月25日 開催の「KEYSTONE SYMPOSIA  
on Molecular and Cellular Biology」において文書をもって発表

(71)出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(71)出願人 598067670

国立精神・神経センター総長

東京都小平市小川東町4-1-1

(72)発明者 武田 伸一

東京都三鷹市下連雀3-42-18-501

(74)代理人 弁理士 佐伯 雄生

(54)【発明の名称】 短縮型ジストロフィン

(57)【要約】 (修正有)

【課題】 本発明は、ジストロフィン遺伝子の骨格筋に対する遺伝子導入法を確立することにある。

【解決手段】 本発明は、ジストロフィン遺伝子のヒンジ1、ヒンジ4及びロッド・ドメインのロッドリピート構造を少なくとも1個有し、4.5 kb以下の長さである塩基配列、又はその塩基配列にハイブリダイズし得る塩基配列を有する筋ジストロフィー症の治療用の遺伝子、これらの遺伝子からなる筋ジストロフィーの治療剤、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター又はレンチウイルスベクターからなる筋ジストロフィーの遺伝子治療用の遺伝子導入媒体、前記の遺伝子を含有してなるアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター、レンチウイルスベクター、又は、アデノウイルスベクター、並びに、当該アデノウイルスからなる筋ジストロフィーの治療剤に関する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ジストロフィン遺伝子のヒンジ1、ヒンジ4及びロッド・ドメインのロッドリピート構造を少なくとも1個有し、4.5 kb以下の長さである塩基配列、又はその塩基配列にハイブリダイズし得る塩基配列を有する筋ジストロフィーの治療用の遺伝子。

【請求項2】 ロッド・ドメインのロッドリピート構造を2個以上有する請求項1に記載の遺伝子。

【請求項3】 さらに、システイン・リッチ・ドメインを有する請求項1又は2に記載の遺伝子。

【請求項4】 アクチン結合ドメインをさらに有する請求項1～3のいずれかに記載の遺伝子。

【請求項5】 C末端ドメインをさらに有する請求項1～4のいずれかに記載の遺伝子。

【請求項6】 遺伝子が配列表の配列番号1に記載された塩基配列又は当該塩基配列にハイブリダイズし得る塩基配列を有する請求項1～5のいずれかに記載された遺伝子。

【請求項7】 遺伝子が配列表の配列番号3、5又は7に記載された塩基配列又は当該塩基配列にハイブリダイズし得る塩基配列を有する請求項1～5のいずれかに記載された遺伝子。

【請求項8】 遺伝子が配列表の配列番号2、4、6又は8に記載されたアミノ酸配列をコードする塩基配列又は当該塩基配列にハイブリダイズし得る塩基配列を有する請求項1～7のいずれかに記載された遺伝子。

【請求項9】 配列表の配列番号9又は11に記載された塩基配列又は当該塩基配列にハイブリダイズし得る塩基配列を有する遺伝子。

【請求項10】 請求項1～8のいずれかに記載の遺伝子からなる筋ジストロフィーの治療剤。

【請求項11】 アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター、又は、レンチウイルスベクターからなる筋ジストロフィーの遺伝子治療用の遺伝子導入媒体。

【請求項12】 請求項1～8のいずれかに記載の遺伝子を含有してなる請求項7に記載の遺伝子導入媒体。

【請求項13】 請求項1～8のいずれかに記載の遺伝子を含有してなるベクター。

【請求項14】 ベクターがアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター、アデノウイルスベクター、又は、レンチウイルスベクターである請求項13に記載のベクター。

【請求項15】 請求項13又は14に記載のベクターを含有してなる筋ジストロフィーの治療剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ジストロフィン遺伝子のヒンジ1、ヒンジ4及びロッド・ドメインのロッドリピート構造を少なくとも1個有し、4.5 kb以下の長さである塩基配列、又はその塩基配列にハイブリダイズし得る塩基配列を有する筋ジストロフィーの治療用

の遺伝子、これらの遺伝子からなる筋ジストロフィーの治療剤、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター又はレンチウイルスベクターからなる筋ジストロフィーの遺伝子治療用の遺伝子導入媒体、前記の遺伝子を含有してなるアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター、レンチウイルスベクター又はアデノウイルスベクター、並びに、これらのベクターからなる筋ジストロフィーの治療剤に関する。

## 【0002】

【従来の技術】X染色体連鎖性劣性の遺伝形式をとる重症の遺伝性筋疾患であって、しかもその発症頻度が高い（出生男児3,500人に1人）デュシェンヌ型（Duchenne型）筋ジストロフィー（DMD）（エメリ著「デュシェンヌ筋ジストロフィー」第2版、オクスフォード大学[Emery, A.E.H. (1993) Duchenne Muscular Dystrophy, 2nd ed., Oxford University Press, Oxford.] 参照）では、ポジショナルクローニング（positional cloning）の結果として、原因遺伝子であるジストロフィン遺伝子（14 kb）が単離され（ケニッヒら、セル、50巻、509-517頁（1987年）

[Koenig, M., Hoffman, E.P., Bertelson, C.J., Monaco, A.P., Feener, C. and Kunkel, L.M., (1987) Cell, 50, 509-517]）、遺伝子異常と病態の関連についても、ジストロフィン結合蛋白の関与を含めて研究が進められている。

【0003】しかし、DMD患児の骨格筋で欠損しているジストロフィンは膜に関連した細胞骨格蛋白であって（ズブルジッカーガーレンら、ネイチャー、333巻、466-469頁（1988年）[Zubrzycka-Gaaran, E.E., Bulman, D.E., Karpati, G., Burghes, A.H. M., Belfall, B., Klamut, H.J., Talbot, J., Hodges, R.S., Ray, P.N. and Worton, R.G. (1988) Nature 333, 466-469.]、及び、アラハタら、ネイチャー、333巻、861-863頁（1988年）[Arahata, K., Ishiura, S., Ishiguro, T., Tsukahara, T., Suhara, Y., Eguchi, C., Ishihara T., Nonaka, I., Ozawa, E. and Sugita H. (1988) Nature 333, 861-863.]）、薬物治療に期待することは難しく、しかも発症者の3分の1は、母体の卵細胞レベルにおける突然変異によるため、出生前診断が必ずしも有効ではない。

【0004】従って、遺伝子治療が考慮されている。筋ジストロフィーに対する遺伝子治療を確立するためにには、骨格筋に対して効率が高く安全域の広い方法が望まれる。これまで、感染力の強いアデノウイルスベクターを用いた研究が盛んに行われてきた（ラゴットら、ネイチャー、361巻、647-650頁（1993年）[Ragot, T., Vincent, N., Chafey, P., Vigne, E., Gilgenkrantz, H., Couton, D., Cartaud, J., Briand, P., Kaplan, J.-C., Perricaudet, M. and Kahn, A. (1993) Nature 361, 647-650.]、バンソンら、ネイチャー

ジェネティックス、5巻、130-134頁(1993年) [Vincent, N., Ragot, T., Gilgenkrantz, H., Couton, D., Chafey, P., Gregoire, A., Briand, P., Kaplan, J.-C., Kahn, A. and Perricaudet, M. (1993) *Nature Genet.* 5, 130-134.]、デコニックら、プロシーディング オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス USA、93巻、3570-3574頁(1996年) [Deconinck, N., Ragot, T., Marfichal, G., Perricaudet, M. and Gillis, J.M. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 3570-3574.]、及び、アクサディら、ジーン セラピー、7巻、129-140頁(1996年) [Acsadi, G., Lochmiller, H., Jani, A., Huard, I., Massie, B., Prescott, S., Simoneau, M., Petrof, B.J. and Karpati, G. (1996) *Hum. Gene Ther.* 7, 129-140.]。

【0005】しかし、第1世代のアデノウイルスベクターは、導入可能な遺伝子の長さが7.5 kbに限られ、導入遺伝子は染色体に取り込まれないが、ベクターの抗原性は高いという問題を抱えていた(アクサディら、ジーン セラピー、7巻、129-140頁(1996年) [Acsadi, G., Lochmiller, H., Jani, A., Huard, I., Massie, B., Prescott, S., Simoneau, M., Petrof, B.J. and Karpati, G. (1996) *Hum. Gene Ther.* 7, 129-140.] )。

【0006】ジストロフィン分子は、構造上、N末端よりアクチン結合ドメイン、ロッド・ドメイン、システイン・リッチ・ドメイン、及び、C末端ドメインの4つの領域に分けることができる(ケーニッヒら、セル、53巻、219-228頁(1988年) [Koenig, M., Monaco, A.P. and Kunkel, L.M. (1988) *Cell* 53, 219-228.] )。

【0007】このうち、ロッド・ドメインを除く3領域は、形質膜とアクチン・フィラメントを連結するのに必要なドメインである(ヘミングスら、ジャーナル セルバイオロジー、116巻、1369-1380頁(1992年) [Hemmings, L., Kuhlman, P.A. and Critchley, D.R. (1992) *J. Cell Biol.* 116, 1369-1380.] 、及び、スズキら、ヨーロピアン ジャーナル オブ バイオケミストリー、220巻、283-292頁(1994年) [Suzuki, A., Yoshida, M., Hayashi, K., Mizuno, Y., Hagiwara, Y. and Ozawa, E. (1994) *Eur. J. Biochem.* 220, 283-292.] )。

【0008】ロッド・ドメイン(24個のリピート及びヒンジ構造からなる)は、ジストロフィン分子の76%を占め、スペクトリンとの相同性が高いことから、膜の裏打ち構造との関連が予想されてきたが、この領域の遺伝子欠失は臨床的に症状の軽いベッカー型筋ジストロフィー(BMD)を引き起こすとされている(ベッグスら、ジャーナル ヒューマン ジェネティックス、49巻、54-67頁(1991年) [Beggs, A.H., Hoffman, 50

an, E.P., Snyder, J.R., Arahata, K., Specht, L., Shapiro, F., Angelini, C., Sugita, H. and Kunkel, L.M. (1991) *Am. J. Hum. Genet.* 49, 54-67.] )。実際に、ロッド・ドメインの約60%を欠失した、ごく軽症のBMD患者が報告されている(イングランドら、ネイチャーレポート、343巻、180-182頁(1990年) [England, S.B., Nicholson, L.V.B., Johnson, M.A., Forrest, S.M., Love, D.R., Zubrzycka-Gaarn, E.E., Bulman, D.E., Harris, J.B. and Davies, K.E. (1990) *Nature* 343, 180-182.] )。

【0009】このような患者の出現を契機にして、ロッド・ドメインの60%を欠失した6.3 kbのミニ・ジストロフィン遺伝子がクローニングされ、トランスジェンとしてmdxマウスに導入、あるいは第一世代のアデノウイルスベクターに組み込んでmdxマウス骨格筋に導入した場合には、筋ジストロフィーの所見を改善することが証明されている(ラゴら、ネイチャーレポート、361巻、647-650頁(1993年) [Ragot, T., Vincent, N., Chafey, P., Vigne, E., Gilgenkrantz, H., Couton, D., Cartaud, J., Briand, P., Kaplan, J.-C., Perricaudet, M. and Kahn, A. (1993) *Nature* 361, 647-650.] 、バンソンら、ネイチャーレポート、5巻、130-134頁(1993年) [Vincent, N., Ragot, T., Gilgenkrantz, H., Couton, D., Chafey, P., Gregoire, A., Briand, P., Kaplan, J.-C., Kahn, A. and Perricaudet, M. (1993) *Nature Genet.* 5, 130-134.] 、デコニックら、プロシーディング オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス USA、93巻、3570-3574頁(1996年) [Deconinck, N., Ragot, T., Marfichal, G., Perricaudet, M. and Gillis, J.M. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 3570-3574.] 、及び、アクサディーら、セラピー、7巻、129-140頁(1996年) [Acsadi, G., Lochmiller, H., Jani, A., Huard, I., Massie, B., Prescott, S., Simoneau, M., Petrof, B.J. and Karpati, G. (1996) *Hum. Gene Ther.* 7, 129-140.] )。

【0010】ミニ・ジストロフィン遺伝子と第一世代のアデノウイルスベクターの組み合わせが抱えていたベクターの抗原性と、組み込むことができる遺伝子の長さ制限について、二つの方向で研究が進んでいる。一つは、全てのアデノウイルス蛋白遺伝子を取り去った新しい世代のアデノウイルスベクター(gut-less adenovirus vector)の開発である。この方法は、ベクターの抗原性を軽減するだけでなく、35 kb以下の長い遺伝子の組換えを可能にした(コチャネックら、プロシーディング オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス USA、93巻、5731-5736頁(1996年) [Kochanek, S., Clemens, P.R., Mitani, K., Chen, H.-H., Chan, S. and Caskey, C.T. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 5731-5736.] )。

ad. Sci. USA 93, 5731-5736.]）。しかし、ベクターの作製のために必要なヘルパーウイルスが最終的な産物にも混入すること、現状では、力値の測定のためのマークとして 1a c Z 遺伝子を要することなどが問題点として残されている。

【0011】もう一つの方向は、より抗原性の低い新たなウイルスベクターの開発である。最近、染色体への組み込みにより骨格筋に対して長期の安定した遺伝子導入が可能であるベクターとして、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターが開発され、しかも抗原性が低いことが明らかにされた (フィシャーら、ネイチャー メディシン、3巻、306-312頁 (1997年) [Fisher, K.J., Jooss, K., Alston, J., Yang, Y., Haecker, S. E., High, K., Pathak, R., Raper, S.E. and Wilson, J. M. (1997) Nature Med. 3, 306-312.] )。しかしながら、このベクターをジストロフィン遺伝子と組み合わせる場合の問題点は、導入遺伝子がわずか 4.5 kb に制限されていることである (フェラリーら、ネイチャーメディシン、3巻、1295-1297頁 (1997年) [Ferrari, F.K., Xiao, X., McCarty, D. and Samu 10 Iski, R.J. (1997) Nature Med. 3, 1295-1297.] )。

#### 【0012】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、これらの問題を克服して、ジストロフィン遺伝子の骨格筋に対する遺伝子導入法を確立することにある。

【0013】本発明者らは、他のウイルスベクターにも応用可能な最小サイズの機能的なジストロフィン遺伝子を得るために、ミニ・ジストロフィン遺伝子のロッド部分を更に欠失した短縮型のジストロフィン遺伝子を構築した。次に、短縮型のジストロフィン遺伝子をアデノウイルスベクターに組み込んで、培養骨格筋細胞と成熟 m 20 d x マウスの骨格筋に導入し、その発現の安定性とジストロフィンと結合しているジストロフィン結合蛋白 (DAP) の発現が回復するかどうかを検証した。

【0014】また、本発明者らは、1a c Z 遺伝子を組み換えたアデノウイルスベクターを、培養骨格筋細胞並びに成熟マウス骨格筋に対して導入し、CAGプロモーター (ニワら、ジーン、108巻、193-200頁 (1991年) [Niwa, H., Yamamura, K. and Miyazaki, J. (1991) Gene 108, 193-200.] ) が最も高い遺伝子の発現をもたらすこと、アデノウイルスの導入に伴って、アデノウイルス蛋白及び導入遺伝子産物に対する免疫反応を生ずるが、それらはマウスのストレインにより異なることを明らかにした。これらの結果から、遺伝子治療に直接応用するには多くの問題を抱えている第1世代のアデノウイルスベクターは、培養細胞および成熟マウス骨格筋に対する遺伝子導入法としては、優れていると考え、短縮型ジストロフィン遺伝子の発現検定法として用いることにした。

#### 【0015】

【課題を解決するための手段】本発明は、ジストロフィン遺伝子のヒンジ1、ヒンジ4及びロッド・ドメインのロッドリピート構造を少なくとも1個有し、4.5 kb 以下の長さである塩基配列、又はその塩基配列にハイブリダイズし得る塩基配列を有する筋ジストロフィーの治療用の遺伝子に関する。本発明の遺伝子は、ロッド・ドメインのロッドリピート構造を2個以上有していてよい。さらに、本発明の遺伝子は、システイン・リッチ・ドメイン、アクチン結合ドメイン、及び/又は、C末端ドメインをさらに有していてよい遺伝子に関する。また、本発明は、これらの遺伝子からなる筋ジストロフィーの治療剤に関する。

【0016】また、本発明は、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターからなる、筋ジストロフィーの遺伝子治療用の遺伝子導入媒体に関する。即ち、本発明は筋ジストロフィーの遺伝子治療用の遺伝子導入媒体として、抗原性の少ないアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いることを特徴のひとつとするものである。本発明は、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターが、前記した本発明の遺伝子のいずれかを含有してなる筋ジストロフィーの遺伝子治療用の遺伝子導入媒体に関する。

【0017】さらに、本発明は、前記した本発明の遺伝子のいずれかを含有してなるベクター、好ましくはアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター、アデノウイルスベクター、又は、レンチウイルスベクターに関する。また、本発明は、前記したベクターからなる筋ジストロフィーの治療剤にも関する。

【0018】骨格筋に対する遺伝子導入について、AAVベクターは幾つかの利点を持つが、導入遺伝子の長さ制限 (4.6 kb) の問題を克服するためには、小型でしかも機能を持つジストロフィン遺伝子を持つ必要がある。これまで研究で用いられてきたミニジストロフィン遺伝子 (6.3 kb) は、大きく導入の限界を越えている。そこで、AAVベクターに組み込むことができる長さであって、治療に有効な最少限のジストロフィン遺伝子の構築を想定した。

【0019】全長型ジストロフィン遺伝子は、N末端よりアクチン結合ドメイン、ロッド・ドメイン、システイン・リッチ・ドメイン、そして、C末端ドメインをコードしている。本発明者らは、8個のロッド・リピートを持つヒトミニ・ジストロフィン遺伝子 (6.3 kb) を材料にして、ロッド・ドメインを更に短縮した6種類のロッド短縮型ジストロフィンcDNAを構築した (図1のA)。全ての構築物は、N末のアクチン結合ドメイン、システイン・リッチ・ドメイン、そして、C末端ドメインを残している。

【0020】デザインされた△DysAX2, AX1 1, AH3 及び M3 は、それぞれ、3個、3個、2個、1個のロッド・リピートとヒンジ1とヒンジ4の両方を持つている。これらの4つの短縮型ジストロフィンにお

いて、融合部分でロッドリピートの推定トリプルヘリカル構造(ケーニッヒら、ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー、265巻、4560-4566頁(1990年) [Koenig, M. and Kunkel, L.M. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 4560-4566.] )を維持するようにcDNAをデザインした(図1のB)。一方、 $\Delta$ DySH1及びH4は、ロッド・リピートは全く持たず、それぞれ、ヒンジ1か4のどちらかを持っている(図1のA、図1のC)。これらのcDNAの構築のために使用したプライマーやオリゴヌクレオチドの塩基配列は、後述する実施例1の表1に示されている。

【0021】本発明者らが構築した、ヒンジ1を含むN末端とヒンジ4を含むC末端を保持し、ロッド・リピートを一つだけ持つ短縮型ジストロフィン遺伝子 $\Delta$ DySH3は、新生仔m<sub>d</sub>xマウス骨格筋への導入実験により、筋ジストロフィーの表現型を改善する機能をもつことを確認した。 $\Delta$ DySH3よりも構造的に小さなジストロフィンについては、即ち、ロッドドメインを全て欠くが、ヒンジ1とヒンジ4を保持しているジストロフィン遺伝子については、ジストロフィンとして形質膜に局在するが、筋ジストロフィーの所見を改善し得ない。また、ヒンジ4の後半からC末端よりの小型ジストロフィンDp71は、筋ジストロフィーの所見をむしろ悪化させることも知られている。従って、これまでのところ、 $\Delta$ DySH3は、最小のジストロフィン機能単位であると考えられる。

【0022】次に、これらのジストロフィン遺伝子の構築について述べる。即ち、ヒトミニ・ジストロフィンcDNAである6.3kbの遺伝子のNotI/SalI断片を、プラスミドpBluescriptII(SK+) (ストラタジーン(Stratagene)社製)のNotI/SalI部位に挿入して、プラスミドpBSBMDを作製した。

【0023】得られたプラスミドpBSBMDとプライマーF1/R1(表1参照)またはF2/R2(表1参照)で増幅したPCR断片を、AflII/XbaIで切断した後、pBSBMDのAflII/XbaI部位に挿入し、それぞれ、pBS $\Delta$ DySH2またはpBS $\Delta$ DySH3を作製した。次に、鋳型のpBSBMDとプライマーF4/R4(表1参照)で増幅したPCR産物をMunI/HindIIIで切断した後、pBSBMDのMunI/HindIII部位に挿入し、pBS $\Delta$ DySH3を作製した。続いて、オリゴヌクレオチドF3/R3(表1参照)のアニーンリングにより作製した断片を、pBSBMDのAflII/HindIII部位の連結に使用し、pBS $\Delta$ DySH3を作製した。これらの挿入断片は、連結した際、ロッド・リピートのトリプル・ヘリカル構造を維持するようにデザインした。連結したロッド・リピートのアミノ酸配列を図1のBに示す。

【0024】この結果、 $\Delta$ DySH2, AX11, AH3及びM3は、N末端のアクチン結合ドメイン、システイン・リッチ・ドメインとC末端ドメインを保持し、更にそれぞれ3個、3個、2個、1個のロッド・リピートとヒンジ1と4の両方を持つ。 $\Delta$ DySH1と $\Delta$ DySH4のcDNAをもつ2個のプラスミドは、pBS $\Delta$ DySH3(図1のA)から作製した。1個のEcoO109I部位を除くために、pBS $\Delta$ DySH3をApalで切断し、平滑化後、セルフライゲーションさせ、pBS $\Delta$ DySH3bを作製した。鋳型のpBS $\Delta$ DySH3とプライマーF5/R5(表1参照)を使って増幅したPCR産物をEcoT22I/EcoO109Iで切断した後、これをpBS $\Delta$ DySH3bのEcoT22I/EcoO109I部位に挿入し、pBS $\Delta$ DySH1を作製した。

【0025】pBS $\Delta$ DySH4の作製のために、pBS $\Delta$ DySH3を鋳型とし、プライマーF5/R6(表1参照)あるいはF6/R7(表1参照)を使って2種類のPCR反応を別個に行った。得られた2種類のPCR産物の混合物を鋳型として、プライマーF5/R7(表1参照)を使って2回目のPCR反応を行った。得られた断片をEcoRVで切断した後、これをpBS $\Delta$ DySH3中の2個のEcoRV部位の間に挿入した。連結領域のアミノ酸配列を図1のCに示す。得られた $\Delta$ DySH1及びH4は、ロッド・リピートは全く持たず、それぞれ、ヒンジ1か4のどちらかを持つ(図1のA)。

【0026】図1は、様々な数のロッド・リピートを持つ短縮型ジストロフィン遺伝子の構築を示したものである。図1のAは、ヒト全長型ジストロフィン遺伝子、ミニジストロフィン遺伝子及び新しく作製した短縮型ジストロフィンcDNAの一覧図である。 $\Delta$ DySH2,  $\Delta$ DySH3,  $\Delta$ DySH4及び $\Delta$ DySH3を構築するために、ミニジストロフィンcDNAの中央部のロッド・ドメインをそれぞれの構築物の右側に示した制限酵素で切断した。ロッド・リピート構造を再構築するために、PCR増幅断片あるいは合成DNA断片を使って得られた両末端を連結させた。 $\Delta$ DySH1及び $\Delta$ DySH4を構築するために、 $\Delta$ DySH3を図示した制限酵素で切断後、PCR増幅断片を使って両末端を連結した。点線は連結部を示す。cDNAのサイズと短縮型ジストロフィンの推定分子量を右側に示す。アクチン結合ドメインを点々のボックスで、ロッド・ドメインを白抜きのボックスで(それぞれのリピートを1個のボックスで示す)、システイン・リッチ・ドメインを斜線の入ったボックスで、そして、C末端ドメインは陰を付けたボックスで図示する。黒色のボックスはヒンジを示す。ヒンジの記載はM. KoenigとL. M. Kunkelの記述に従った。

【0027】図1のBは、 $\Delta$ DySH2(AX2),

$\Delta$ Dy<sub>s</sub>AX11 (AX11),  $\Delta$ Dy<sub>s</sub>AH3 (AH3) 及び  $\Delta$ Dy<sub>s</sub>M3 (M3) における再構築したロッド・リピートのアミノ酸配列を示す。縦線は連結部位を示す。三角形と点線は、ロッド・リピートの整列を最適化するためのギャップと欠失の位置を示す (M. Koenig and L. M. Kunkele による)。CS1とCS2はジストロフィンの24個のリピートのコンセンサス配列を示す。CS1は、24個のリピートのうち少なくとも8個のリピートの中に見つかったアミノ酸を、CS2は5、6あるいは7個のリピートに見られるアミノ酸を示す。

【0028】図1のCは、 $\Delta$ Dy<sub>s</sub>H1 (H1) 及び  $\Delta$ Dy<sub>s</sub>H4 (H4) における連結領域のアミノ酸配列  $\Delta$ Dy<sub>s</sub>H1 (H1) では、ヒンジ1はシステイン・リッチ・ドメインに直結する。 $\Delta$ Dy<sub>s</sub>H4 (H4) では、アクチン結合ドメインはヒンジ4に直結する。ヒンジ1にあるチロシン (T) (星印) は、北アメリカのXLCMの家系でアラニン (A) に変異していた。ヒンジ4以下の点線はWWドメインを示す；WWドメインのうち、最も保存されたアミノ酸を下線で示す。

【0029】次に、前記の方法で得られたそれぞれの短縮型ジストロフィンcDNAをアデノウイルスベクターに導入する方法について述べる。COS-TPC法 (ミヤケラ、プロシーディング オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス USA、93巻、1320-1324頁 (1996年) [Miyake, S., Makimura, M., Kanegae, Y., Harada, S., Sato, Y., Takamori, K., Tokuda, C. and Saito, I. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 1320-1324.] ) により、各短縮型ジストロフィンを発現するE1置換型組み換えアデノウイルスベクターを作製することができる。

【0030】前記の方法で得られたそれぞれの短縮型ジストロフィンcDNA、 $\Delta$ Dy<sub>s</sub>AX2、AX11、AH3、M3、H1及びH4を、カセットコスミドpAXCAwt (カネガエラ、ヌクレイク アッシュ レサー チ、23巻、3816-3821頁 (1995年) [Kanegae, Y., Lee, G., Sato, Y., Tanaka, M., Nakai, M., Sakaki, T., Sugano, S. and Saito, I. (1995) Nucleic Acids Res. 23, 3816-3821.] ) のCAG発現ユニット (ニワら、ジーン、108巻、193-200頁 (1991年) [Niwa, H., Yamamura, K. and Miyazaki, J. (1991) Gene 108, 193-200.] ) の中へ挿入した。この発現ユニットは、試験管内 (in vitro) (前掲、ニワらの文献) 及び生体内 (in vivo) (アラキら、プロシーディング オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス USA、92巻、160-164頁 (1995年) [Araki, K., Araki, M., Miyazaki, J. and Vassalli, P. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 160-164.] )において、強い発現を示すことが知られている。

【0031】各組み換えアデノウイルスの作製は、293細胞内において、得られたコスミドと Ad5 d1x (サイトウら、ジャーナル オブ ヴァイロロジー、54巻、711-719頁 (1985年) [Saito, I., Oya, Y., Yamamoto, K., Yuasa, T. and Shimojo, H. (1985) J. Virol. 54, 711-719.] ) のDNA-末端蛋白質複合体との間の相同性組み換えにより行われた。得られた組み換えアデノウイルスベクターを、 $\Delta$ xCA $\Delta$ Dy<sub>s</sub>と命名し、既に述べられた方法 (カネガエラ、ジャパンニーズ ジャーナル オブ メディカル サイエンス バイオロジー、47巻、157-166頁 (1994年) [Kanegae, Y., Makimura, M. and Saito, I. (1994) Jpn. J. Med. Sci. Biol. 47, 157-166.] ) で、増殖、精製及び力価測定を行った。各 $\Delta$ xCA $\Delta$ Dy<sub>s</sub>を10%グリセロールを含むリン酸緩衝化生食水 (PBS) 中、-80°Cで保存した。

【0032】本発明の組み換えアデノウイルスベクターを用いた培養骨格筋細胞における短縮型ジストロフィンの発現を次のようにして確認した。即ち、短縮型ジストロフィンが正しく転写・翻訳されることを調べるために、マウス骨格筋細胞株C2C12細胞に各 $\Delta$ xCA $\Delta$ Dy<sub>s</sub>を感染させウエスタン・プロット解析を行った。C2C12細胞に各組み換えアデノウイルスを100moiの割合で感染させ、その後、培養液の交換により分化を誘導した。感染3日後に、細胞を回収した。全細胞抽出物 (20 μg/ lane) をSDS-PAGE (5%アクリルアミド) で分離し、PVDF膜に転写後、モノクローナル抗体DYS2と反応させた。この抗体はジストロフィンの最後の17アミノ酸に反応する。その結果を図2に示す。図2のレーン1は非感染C2C12細胞からのものであり、レーン2は $\Delta$ xCA $\Delta$ Dy<sub>s</sub>AX2を用いたものであり、レーン3は $\Delta$ xCA $\Delta$ Dy<sub>s</sub>AX1を用いたものであり、レーン4は $\Delta$ xCA $\Delta$ Dy<sub>s</sub>AH3を用いたものであり、レーン5は $\Delta$ xCA $\Delta$ Dy<sub>s</sub>M3を用いたものであり、レーン6は $\Delta$ xCA $\Delta$ Dy<sub>s</sub>H1を用いたものであり、レーン7は $\Delta$ xCA $\Delta$ Dy<sub>s</sub>H4を用いたものである。図2中のMWは、分子量 (kDa) を示す。

【0033】それぞれの短縮型ジストロフィン遺伝子は、予測された大きさを示した (図2、レーン2~6) が、 $\Delta$ Dy<sub>s</sub>H4は予測 (103kDa) よりも大きい位置に出現した (図2、レーン7)。 $\Delta$ xCA $\Delta$ Dy<sub>s</sub>H4 (図2、レーン7) の産物は推測されたよりも移動度が遅かった。内因性のジストロフィンは培養骨格筋細胞では検出されなかった。なぜなら、細胞は十分に成熟した筋管細胞に分化していなかったからである。短縮型ジストロフィンの量を比較した場合、 $\Delta$ Dy<sub>s</sub>M3は最も高い発現レベルを示した。これらの結果は、組み換えた $\Delta$ xCA $\Delta$ Dy<sub>s</sub>が効果的に培養骨格筋細胞に感染し、CAGプロモーターの制御下で短縮型ジストロフィ

11

ンを発現すること、さらに、 $\Delta$ Dy<sub>s</sub>M3蛋白質が最も安定して発現することを示した。

【0034】さらに、組換えアデノウイルスベクターを用いた本発明の短縮型ジストロフィンが、生体内(*in vivo*)において、筋線維で安定に発現するかどうかを調べるために、組み換えたAxCADy<sub>s</sub>を、成熟m<sub>d</sub><sub>x</sub>マウスの前脛骨筋(TA)に直接導入し、免疫組織学的解析を行った(図3(図面に代わる写真))。組み換えたアデノウイルスを、成熟m<sub>d</sub><sub>x</sub>マウスの前脛骨筋に直接導入した。導入したベクター量は、後述する実施例4の表2に記載した量である。注射の7日後、マウスからTAを取り出し、凍結切片とウサギポリクローナル抗体anti-Cを使ってジストロフィンの抗体染色を行った。この抗体は、ジストロフィンのC末端を認識する。

【0035】図3のB10は正常成熟C57BL/10マウスであり、図3のm<sub>d</sub><sub>x</sub>は非導入m<sub>d</sub><sub>x</sub>マウスであり、図3のAX2はAxCADy<sub>s</sub>A<sub>x</sub>2であり、図3のAX11はAxCADy<sub>s</sub>A<sub>x</sub>11であり、図3のAH3はAxCADy<sub>s</sub>AH3であり、図3のM3はAxCADy<sub>s</sub>M3であり、図3のH1はAxCADy<sub>s</sub>H1であり、図3のH4はAxCADy<sub>s</sub>H4をそれぞれ用いた場合を示している。写真中のバーは、スケールを示しており、バーの長さが100μmであることを示している。

【0036】既に報告されているように、HE染色では組み換えたアデノウイルスによる単核細胞の強い浸潤や筋線維の壊死が検出された。ジストロフィン陽性線維は、ダメージを受けた領域の周辺に群れをなして出現する傾向があった。 $\Delta$ Dy<sub>s</sub>H1を除く全ての短縮型ジストロフィンは、一枚の同じスライド上で検討したときにも、正常対照におけるC57BL/10マウスのジストロフィンよりも強く形質膜に発現していた。ジストロフィン陽性線維の割合は、m<sub>d</sub><sub>x</sub>骨格筋に見られるリバータント線維よりも明らかに多かった。さらに、ジストロフィンの19番目のロッド・リピートに対するP23a抗体(ヨシダら、ジャーナルオブバイオケミストリー、108巻、748-752頁(1990年)[Yoshida, M. and Ozawa, E. (1990) J. Biochem. 108, 748-752.])を用いて、ジストロフィン陽性線維がリバータント線維でないことを確認した。

【0037】AxCADy<sub>s</sub>を導入した骨格筋において、ジストロフィンの免疫染色の強度は、線維間で大きく変化していたけれども、AxCADy<sub>s</sub>M3を導入した骨格筋において、強い免疫蛍光が一貫して観察された(図3)。対照的に、AxCADy<sub>s</sub>H1を導入した骨格筋においては、形質膜でのジストロフィン陽性線維のシグナルは、微弱および不連続であった。

【0038】m<sub>d</sub><sub>x</sub>マウスの骨格筋における各短縮型ジストロフィンの効果を評価するために、本発明者らは、それぞれのAxCADy<sub>s</sub>を導入した骨格筋からクラ

12

スターを形成した3ヶ所の領域をピックアップし、短縮型ジストロフィンを発現している線維の数及びジストロフィンの免疫蛍光の強度を、別々に評価した。その結果を、表2に要約した。これらの結果は、短いロッド・ドメインとヒンジ1と4の両方を持つ短縮型ジストロフィンが、効果的に形質膜に局在できることを示唆している。 $\Delta$ Dy<sub>s</sub>H1に見られるように、ヒンジ4の欠失は、形質膜への局在を大きく減少させる結果となった。

【0039】次に、形質膜におけるジストロフィン結合蛋白質(DAP)の発現回復について検討した。ジストロフィン-DAP複合体を形成するための鍵分子としてのジストロフィンの機能を評価するために、本発明者らは、AxCADy<sub>s</sub>を導入後のm<sub>d</sub><sub>x</sub>骨格筋の形質膜におけるDAPsの発現を調べた。AxCADy<sub>s</sub>M3を注射したm<sub>d</sub><sub>x</sub>骨格筋の形質膜におけるジストロフィン結合蛋白質の回復をみるために、図3で説明した方法で遺伝子の導入と抗体染色を行った。図4(図面に代わる写真)にその結果を示す。AxCADy<sub>s</sub>M3を導入したm<sub>d</sub><sub>x</sub>マウスにおいて、ジストロフィンを発現している筋線維は $\beta$ -ジストログリカン、 $\alpha$ -サルコグリカン及び $\alpha$ 1-シントロフィンに対する抗体で強く染色された。ジストロフィン陰性線維(図4中の星印)では、DAPは陰性であった。AxCADy<sub>s</sub>H1を注射したm<sub>d</sub><sub>x</sub>骨格筋では、形質膜でのジストロフィン陽性線維のシグナルは極端に弱かった。そのような線維では、DAPは形質膜に検出されなかった。写真中のバーは、スケールを示しており、バーの長さが50μmであることを示している。

【0040】m<sub>d</sub><sub>x</sub>骨格筋では、DAPsの発現が減少している(オーエンディックら、ジャーナルオブセルバイオロジー、115巻、1685-1694頁(1991年)[Ohlendieck, K. and Campbell, K.P. (1991) J. Cell Biol. 115, 1685-1694.]) (図4)のに対して、AxCADy<sub>s</sub>H1以外のAxCADy<sub>s</sub>を導入した骨格筋では、ジストロフィン陽性線維においてDAPsの形質膜での発現が、著しく回復した。興味深いことに、ジストロフィンの発現レベルに関わらず、DAPsの免疫蛍光の強度が類似していた。しかしながら、AxCADy<sub>s</sub>H1を導入したm<sub>d</sub><sub>x</sub>骨格筋では、形質膜に沿ったDAPsの免疫蛍光は検出困難であった。特に、AxCADy<sub>s</sub>H1を導入したm<sub>d</sub><sub>x</sub>骨格筋のジストロフィン陽性線維では、 $\beta$ -ジストログリカンと $\alpha$ -サルコグリカンのシグナルが極端に低かった。これらの結果から、 $\Delta$ Dy<sub>s</sub>H1以外の形質膜で発現した短縮型ジストロフィンは効果的に形質膜のDAPsの発現を回復させることができた。

【0041】これらの組換えアデノウイルスベクターの成熟マウス骨格筋への導入では、ウイルスベクターの抗原性により、遺伝子導入産物の長期間の発現を期待することができない。しかし、新生仔マウスへの遺伝子導入

では、免疫寛容が成立するので、短縮型ジストロフィン遺伝子を組み込んだ組換えアデノウイルスベクターのうち  $A \times C A \Delta D y s M 3$  について、新生仔  $m d x$  マウス骨格筋への導入を行い、長期間発現させることにより、筋ジストロフィーの表現型を改善することができるかどうか検証した。

【0042】生後1週の  $m d x$  マウス一侧後肢の腓腹筋中央部に  $A \times C A \Delta D y s M 3$  と  $A \times C A L a c Z$  の混合物  $6 \mu l$  を直接導入した。4週間後、後肢の腓腹筋部の骨格筋を取り出し、H&E染色、X-Ga1染色及びジストロフィン染色を行った。この結果、アデノウイルスを注入した側の後肢の腓腹筋群について、アデノウイルスベクターの導入を確認するために、X-Ga1染色を行うと、腓腹筋群のうち浅指屈筋 (flexor digitorum superficialis) において、最も高率に、遺伝子を導入されている線維が認められた。この  $\beta$ -Ga1陽性領域についてジストロフィンの免疫染色を行ったところ、ほとんどの線維においてジストロフィンが発現していた。同部分について、H&E染色を行って詳しく観察したところ、非導入側の浅指屈筋 (flexor digitorum superficialis) と比較して、筋の変性・壊死像及び中心核線維数が著しく減少していた。

【0043】本発明者らは、短縮型ジストロフィン遺伝子を組み込んだ組み換えアデノウイルスベクターを培養骨格筋細胞株 C2C12 及び成熟  $m d x$  マウスの骨格筋に感染させることにより、本発明でデザインした短縮型ジストロフィンが、筋細胞のなかで安定して発現するかどうか検討してきた結果、広い感染域を持つアデノウイルスベクターと骨格筋において強力な CAG プロモーターを組み合わせることにより、成熟  $m d x$  マウスの骨格筋に導入した際の短縮型ジストロフィンの発現を比較することができた。

【0044】ロッド・リピートを1個のみを持つ  $\Delta D y s M 3$  は、試験管内 (in vitro) において最も高い発現を示した。クレメンス等はロッド・ドメインのイン・フレーム欠失を持つ3種の短縮型ジストロフィン (3.0, 4, 4及び5.7 kb欠失) を作製した (クレメンスら、ヒューマン ジーン セラピー、6巻、1477-1485頁 (1995年) [Clemens, P.R., Krause, T.L., Chan, S., Korb, K.E., Graham, F.L. and Caskey, C.T. (1995) *Hum. Gene Ther.* 6, 1477-1485.] )。これらは、15、10または6個のロッド・リピートを持つ。彼らは、培養骨格筋細胞に対する導入実験において、これらのジストロフィンの产生量は、その欠失の大きさのみにより決定されるものではないことを示した。本発明者らも、また、ロッド・ドメイン中に欠失を持つ短縮型ジストロフィンの安定性は、ロッドの数に依存していないと結論した。これらの結果は、欠失の大きさはジストロフィンの产生量や症状の重さのどちらとも関係していないという BMD 患者にみられる所見と一致している

た。

【0045】 $A \times C A \Delta D y s$  を成熟  $m d x$  マウスの骨格筋に導入したときもまた、 $\Delta D y s M 3$  は、より多くのロッド・リピートを持つ短縮型ジストロフィンと同様に効果的に発現した。ジストロフィンが発現している筋線維の頻度は、投与したウイルス量に比例する傾向があった。また、正確な  $\Delta D y s M 3$  の高次構造が決定されたわけではないが、成熟マウスの骨格筋においても安定であることが関与しているように思われる。

【0046】 $A \times C A \Delta D y s H 1$  と  $A \times C A \Delta D y s H 4$  についても、他の  $A \times C A \Delta D y s$  と同じように多量のウイルスを成熟  $m d x$  マウスの骨格筋に導入したが、それらの発現は他の  $\Delta D y s$  に比べて明らかに低かった。これは、 $\Delta D y s H 1$  と  $\Delta D y s H 4$  が共にロッド・リピートを完全に欠失していることが原因であろう。特に、ヒンジ4を欠失した  $\Delta D y s H 1$  の発現は極端に低かった。ヒンジ4には「WWドメイン」 (シュドールら、ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー、270巻、14733-14741頁 (1995年) [Sudol, M., Bork, P., Einbond, A., Kastury, K., Druck, T., Negrini, M., Huebner, K. and Lehman, D. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 14733-14741.] ) が含まれており、このドメインが  $\beta$ -ジストログリカンの XP P XYモチーフに結合することによって、ジストロフィン分子が形質膜に繋ぎ止められていると提唱されている (AINボンドら、フェブス レターズ、384巻、1-8頁 (1996年) [Einbond, A. and Sudol, M. (1996) *FEBS Letters* 384, 1-8.] )。それで、本発明者らは、 $\beta$ -ジストログリカンへの結合が低下したために、 $\Delta D y s H 1$  は不安定化したと推測した。

【0047】 $\Delta D y s H 4$  はヒンジ1を欠失している。ヒンジ1領域の重要性が最近指摘された。北アメリカの X染色体連鎖性拡張型心筋症の家系において、ヒンジ1領域中にミスセンス変異が同定され、ジストロフィン分子の構造が変化していることが想定された (オルティツーロペツラ、サーキュレーション、95巻、2434-2440頁 (1997年) [Ortiz-Lopez, R., Li, H., Su, J., Goytia, V. and Tomin, J.A. (1997) *Circulation* 95, 2434-2440.] )。このような理由から  $\Delta D y s H 4$  の発現の減少には、ヒンジ1の欠損が関与しているのかもしれないと考えた。

【0048】ミニ・ジストロフィン cDNA のトランスジェニックの研究 (ウエルズら、ヒューマン モレキュラー ジェネティックス、4巻、1245-1250頁 (1995年) [Wells, D.J., Wells, K.E., Asante, E.A., Turner, G., Sunada, Y., Campbell, K.P., Walsh, F.S. and Dickson, G. (1995) *Hum. Mol. Genet.* 4, 1245-1250.] ) から予測されたように、 $\Delta D y s M 3$  のような小さな短縮型ジストロフィンでも、C端側のドメインが保持されていれば、 $m d x$  マウス骨格筋において

15

DAPsを集積させることができた。すなわち、本発明の実験により、ヒンジ4とシステイン・リッチ・ドメインの両方を持つ短縮型ジストロフィンは、効果的にDAPsを形質膜に集積させることができた。しかし、注目すべきことは、DAPsの回復が必ずしも筋ジストロフィーの発症の防止または軽減を意味する訳ではないということである。

【0049】形質膜においてDAPsが回復しても、ジストロフィン機能の改善には不十分である場合がある。ジストロフィンの分子種の1つで、ロッド・ドメイン及びN末端のアクチン結合ドメインを欠いているDp71遺伝子をmdxマウスに対して、トランスジーンとして導入した実験では、DAPsが完全な回復を示したにも関わらず、筋ジストロフィーの表現型には、効果的な改善はなかった（コックスら、ネイチャー ジェネティックス、8巻、333-339頁（1994年）[Cox, G.A., Sunada, Y., Campbell, K.P. and Chamberlain, J.S. (1994) *Nature Genet.* 8, 333-339.]、及び、グリーンベルグら、ネイチャー ジェネティックス、8巻、340-344頁（1994年）[Greenberg, D. S., Sunada, Y., Campbell, K.P., Yaffe, D. and Nude 1, U. (1994) *Nature Genet.* 8, 340-344.]）。

【0050】一方、チャンバーレイン（Chamberlain）らは、一連の短縮型ジストロフィン遺伝子を構築し、mdxマウスに対してトランスジーンとして導入して検討したところ、ヒンジ1までのN端側とヒンジ4以下のC端側を持つが、ロッド部分を全て欠損したタイプのジストロフィンは、膜に安定して発現するが、筋ジストロフィーの表現型には改善が見られないことを明らかにしている。この観点から、短縮型ジストロフィン△DysM3の生体内（*in vivo*）での機能を証明するためには、長期的な発現が可能な実験が必要である。

【0051】実際、本発明者らは、新生児のmdxマウス骨格筋に△DysM3をコードしたアデノウイルスベクターを導入して4週後に、その効果を検討したところ、アデノウイルスベクターが導入された部分では、筋変性の減少と筋変性の結果として生ずる筋再生の指標である中心核線維がほぼ消失するという結果を得ている。この短縮型ジストロフィンが、筋ジストロフィーの表現型を改善するかどうかを決定するために、より長期間の発現系が必要であろうと思われる所以、この点についてはさらにトランスジェニックマウスを用いた実験が必要となるかもしれない。

【0052】本発明において、ロッド・リピートを1個でも保持する短縮型ジストロフィンが、成熟したmdxマウスの骨格筋で効果的に発現することを示した。既に明らかのように、第1世代のアデノウイルスベクターは、宿主において強い免疫反応を引き起す。

【0053】そこで、筋ジストロフィーに対する遺伝子治療においては、将来的に、宿主において免疫反応を誘

10

30

40

16

導せず、そして、導入遺伝子の長期発現を与えるような新しいベクターの使用が検討されている。特に、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターは、導入遺伝子が染色体に取り込まれることにより、骨格筋において安定した発現が期待できるという利点を持っている。

【0054】ところが、このベクターに挿入できる遺伝子はわずか、4-4. 5kbに限られていた。従って、ジストロフィン遺伝子については、14kbの全長の遺伝子は勿論、6. 3kbのミニ・ジストロフィン遺伝子にしても、挿入することは不可能である。本発明で得られた短縮型ジストロフィン遺伝子、特にロッド・リピートを1個のみ保持する3. 7kbの△DysM3cDN Aは、アデノ随伴ウイルスベクターに挿入する極めて良好な遺伝子である。

【0055】以上の結果から明らかなように、本発明の筋ジストロフィーの治療用の遺伝子は、ジストロフィン遺伝子のヒンジ1、ヒンジ4及びロッド・ドメインのロッドリピート構造を少なくとも1個有し、4. 5kb以下の長さである塩基配列、又はその塩基配列にハイブリダイズし得る塩基配列を有することを特徴とするものである。本発明の遺伝子は、ロッド・ドメインのロッドリピート構造を1個有していればよいのであるが、場合によつては2個以上、好ましくは2個又は3個有していくもよい。これらのロッドリピート構造は、全く同じ塩基配列を有するものが好ましいが、その一部が他の塩基で置換されても、さらに他の塩基配列が付加されても、また、一部の塩基が欠失してもよい。

【0056】本発明の遺伝子は、さらに、システイン・リッチ・ドメイン、アクチン結合ドメイン、及び、C末端ドメインを有しているものが好ましい。本発明のcDNAは、全長が4. 5kb以下であればよく、好ましくは4. 2kb以下、より好ましくは4. 0kb以下、さらに好ましくは3. 7kb以下であってもよい。

【0057】本発明の遺伝子は、これを筋ジストロフィーの治療剤として用いることができる。本発明の遺伝子を患者に導入する方法としては、従来から使用されてきた方法を使用することもできるが、本発明の遺伝子をアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターに組み込んで使用するのが好ましい。導入方法は公知の方法を採用することができる。

【0058】また、本発明は、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターからなる筋ジストロフィーの遺伝子治療用の遺伝子導入媒体を提供するものである。アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターは、他の疾患の遺伝子治療用の遺伝子導入媒体として使用されていたが、本発明により初めて筋ジストロフィーの遺伝子治療用の遺伝子導入媒体として使用できる可能性が判明し、当該ベクターの新たな用途を見出したものである。筋ジストロフィーの遺伝子治療用の遺伝子導入媒体は、前記した本発明の遺伝子のいずれかを含有してなるものが好ましいが、本

50

発明の筋ジストロフィーの遺伝子治療用の遺伝子導入媒体は、これらに限定されるものではない。

【0059】本発明のアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターは、前記した本発明の遺伝子のいずれかを含有するものである。アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターに本発明の遺伝子を導入する方法には、特に制限はなく、当業者が通常行う方法により導入することができる。また、本発明のアデノウイルスベクターは、前記した本発明の遺伝子のいずれかを通常の方法によりアデノウイルスベクターに導入することにより製造することができる。

【0060】本発明のアデノウイルスからなる筋ジストロフィーの治療剤は、ウイルスを用いた従来の遺伝子治療法と同様な方法で使用することができる。

#### 【0061】

【実施例】以下に実施例を挙げて、本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

#### 【0062】実施例1（ロッド短縮型ジストロフィン遺\*

プライマー	プライマーの配列（5' - 3'）	配列の位置
F1	<u>GGCGGCCAACAACTTAAGGTATTG</u>	1799-1816
2	<u>GGCGGCCCTTAAGGAGGTCAATACTGAG</u>	8936-8950
3	<u>TTAAGGTATTGAAACACCAGATGGA</u>	1806-1816, 9269-9281
4	<u>GCGGCCAACATTGGGAAGTAAAGCTG</u>	1409-1426
5	<u>GGAACATGCATTCAACATCGCC</u>	796-817
6	<u>CAGGAAGTGGAAAGCCCACAGGGACTTTGGTCCAG</u>	953-964, 9329-9350
R1	<u>GCCGCCCTCGAGACTTGTATAACATTTC</u>	2005-1991
2	<u>GGCCCTTGAATTCTCGAGGTGATC</u>	9144-9125
3	<u>AGCTTCCATCTGGTGTCAATACC</u>	9285-9269, 1816-1810
4	<u>GCCGCAAGCTTCCATCTTGAATTAG</u>	1501-1486
5	<u>CGGCAGGGCTTCTGCAGTCCTCGGTCTCAGGAGCTTCC</u>	9564-9545, 1189-1174
6	<u>GTCCCTGTGGGCTTCCACTTCCCTGGATGGC TTC</u>	9340-9329, 964-944
7	<u>ATCTGCAGGATATCCATGG</u>	9657-9639

【0064】表1中の、短縮型ジストロフィンの構築のために使用した合成オリゴヌクレオチドのDNA配列オリゴヌクレオチドF3とR3は、DNA断片形成のために直接アニーリングするのに使用した。他のオリゴヌクレオチドは、PCR反応のためのプライマーとして使用した。下線は、ヒトジストロフィンcDNAの塩基配列（GeneBank accession number M18533）に相当する。錠型のpBSBMDと、プライマーF1/R2またはF2/R2で増幅したPCR断片をAflII/XbaIで切断した後、pBSBMDのAflII/XbaI部位に挿入し、それぞれ、pBSΔDysAX2またはpBSΔDysAX11を作製した。錠型のpBSBMDとプライマーF4/R4で増幅したPCR産物をMunI/HindIIIで切斷した後、pBSBMDのMunI/HindIII部※50

※位に挿入し、pBSΔDysM3を作製した。オリゴヌクレオチドF3/R3のアニーリングにより作製した断片を、pBSBMDのAflII/HindIII部位の連結に使用し、pBSΔDysAH3を作製した。

【0065】一方、ΔDysH1とΔDysH4のcDNAをもつ2個のプラスミドは、pBSΔDysM3（図1のA参照）から作製した。まず、EcoO109I部位を一つ除くために、pBSΔDysM3をApaIで切断、平滑化後、セルフライゲーションさせpBSΔDysM3bとした。錠型のpBSΔDysM3と、プライマーF5/R5を使って増幅したPCR産物を、EcoT22I/EcoO109Iで切断した後、pBSΔDysM3bのEcoT22I/EcoO109I部位に挿入し、pBSΔDysH1を作製した。pBSΔDysH4の作製のためには、2種類のPCR反応

を、pBSΔDysM3を錆型として、プライマーF5/R6あるいはF6/R7を使って別個に行つた。得られた2種類のPCR産物の混合物を錆型として、プライマーF5/R7を使って2回目のPCR反応を行つた。得られた断片をEcoRVで切斷した後、これをpBSΔDysM3中の2個のEcoRV部位の間に挿入した。連結領域のアミノ酸配列を図1のBと図1のCに示す。

【0066】得られた4種のM3、AX11、AX2、及び、AH3のcDNAの塩基配列を配列表の配列番号1、3、5、及び7にそれぞれ示す。また、2種のH1及びH4のcDNAの塩基配列を配列表の配列番号9及び11にそれぞれ示す。これらのcDNAによりコードされるアミノ酸配列を配列表の配列番号2、4、6、8、10、及び、12にそれぞれ示す。

【0067】実施例2(短縮型ジストロフィンを発現する組み換えアデノウイルスベクターの作製)  
COS-TPC法により、各短縮型ジストロフィンを発現するE1置換型組み換えアデノウイルスベクターを作製した。それぞれの短縮型ジストロフィンcDNA、△DysAX2、AX11、AH3、M3、H1及びH4を、カセットコスミドpAXCAwtのCAG発現ユニットの中へ挿入した。この発現ユニットは、試験管内(in vitro)及び生体内(in vivo)において、強い発現を示す。各組み換えアデノウイルスベクターの作製は、293細胞において、得られたコスミドとAd5-d1xのDNA-末端蛋白質複合体との間の相同性組み換えにより行われた。得られた組み換えアデノウイルスベクターを、AXCAΔDysと命名し、既に述べられた方法で、増殖、精製及び力値測定を行つた。各AXCAΔDysを10%グリセロールを含むリン酸緩衝化生食水(PBS)中、-80°Cで保存した。

【0068】実施例3(アデノウイルスベクターを用いた培養骨格筋細胞への遺伝子導入)  
C2C12筋芽細胞のサブクローンの一つ(ヨシダら、ジャーナルオブセルバイオロジー、132巻、818-193頁(1996年)[Yoshida, S., Fujisawa-Sehara, A., Taki, T., Arai, K. and Nabeshima, Y. (1996) J. Cell Biol. 132, 181-193.]) (約1.0×10<sup>5</sup>個)を、6cmコラーゲンコートディッシュに撒き、20%(v/v)仔牛血清を含むDMEM

中で1日間培養した。筋芽細胞にAXCAΔDysを100plaque-forming unit(pfu)/cell(moi)の割合で感染させ、増殖培地をDMEMと5%(v/v/v)ウマ血清を含む分化培地に置き換えた。3日後、細胞を回収し、SDS-PAGE溶解バッファー(15%SDS、70mM Tris-HCl pH 6.8、5%β-メルカプトエタノール(β-mercaptoethanol)、10mM EDTA)に懸濁した。

【0069】1レーン当り、20μgの細胞溶解液を5%SDS-PAGEで分離し、PVDF膜(Immobilion(TM)、Millipore)にエレクトロプロッティングさせた。プロットを100倍希釈したジストロフィンモノクローナル抗体DYS2(Novocastra)とインキュベーションした。この抗体は、ヒト・ジストロフィンの最後の17アミノ酸を認識する。プロット上の免疫複合体を、パーオキシダーゼ標識したウサギ抗マウスIgG1(Zymed)とECLウエスタン・プロティング検出試薬(Amersham)を用いて検出した。

【0070】結果を図2に示す。△DysH4を除く、それぞれの短縮型ジストロフィンは予測された大きさを示した。短縮型ジストロフィンの発現量の比較では、△DysM3が最も高い発現レベルを示した。これらの結果は、組み換えたAXCAΔDysが効果的に培養骨格筋細胞に感染し、CAGプロモーターの制御下で短縮型ジストロフィンを発現することを示している。

【0071】実施例4(アデノウイルスベクターを用いたmdxのマウス骨格筋への生体内(in vivo)遺伝子導入)

生体内(in vivo)遺伝子導入の前に、グリセロールを除去するために、各AXCAΔDysのストックをPBSで飽和させたCHROMA SPIN™カラム(C1ontech)に通した。精製したAXCAΔDys液50μlを、12-16週齢のmdxマウスの左足の前到筋に27ゲージの注射針を用いて直接注射(筋注)した。導入した各々のベクターの量とその結果を次の表2に示す。

【0072】

【表2】

21

22

組換 アデノウイルス	ウイルスの投与量 ( $\times 10^8$ pfu/筋)	ジストロフィン 陽性線維 平均(範囲)	形質膜における 免疫蛍光の強度	n
AxΔDysAX2	8.6	32% (22-39)	++	4
AxΔDysAX11	2.2	27% (11-56)	++	4
AxΔDysAH3	14	33% (15-45)	++	4
AxΔDysM3	16	33% (22-51)	+++	8
AxΔDysH1	6.0	12% (3-22)	+	3
AxΔDysH4	13	21% (16-31)	++	3

【0073】表2は、ベクターの使用量とアデノウイルスベクターを用いて短縮型ジストロフィンcDNAをm d x骨格筋へを導入した際の定量分析の結果を示している。表2中の「\*」印は、選択領域のジストロフィン陽性線維の百分率を示し、「\*\*」印はジストロフィンの形質膜でのシグナル強度を0から+++)に評価した結果を示している。1週間後、骨格筋を取り出し、液体窒素で冷却したイソペンタン中で凍結させた。遺伝子導入を行った、及び、遺伝子導入していないm d x骨格筋と正常対照のC57BL/10骨格筋から、6 μmの切片を同じ1枚のスライド上に準備して風乾した後、アセトンで10分間固定した。

【0074】次に挙げる抗体を用いて免疫組織染色を行った。ジストロフィンの最C末端25アミノ酸を認識するウサギポリクローナル抗体(anti-C、野々村(Y. Nonomura)博士より入手した。)、19番目のロッドリピートに相当するジストロフィンのアミノ酸2360から2409を認識するウサギポリクローナル抗体(P23a、吉田(M. Yoshida)博士より入手した。)(ヨシダら、ジャーナルオブバイオケミストリー、108巻、748-752頁(1990年)[Yoshida, M. and Ozawa, E. (1990) J. Biochem. 108, 748-752.])、β-ジストログリカンに対するヤギポリクローナル抗体、α-サルコグリカンに対するウサギポリクローナル抗体(若山(Y. Wakayama)博士より入手した。)(ワカヤマら、アナルスオブニューロロジー、39巻、217-223頁(1996年)[Wakayama, Y., Inoue, M., Murahashi, M., Shibusawa, S., Jimi, T., Kojima, H. and Oniki, H. (1996) Ann. Neurol. 39, 217-223.])、α1-シントロフィンのアミノ酸191から206(ピーターら、ニューロレポート、5巻、1577-1580頁(1994年)[Peters, M.F., Kramarcz, N.R., Sealock, R. and Froehner, S.C. (1994) NeuroReport 5, 1577-1580.])に対するウサギポリクローナル抗体(亀谷(S. Kameya)博士より入手した。)。

【0075】一次抗体を、FITC標識したヤギ抗ウサギIgG(Tago Immunological)、或いは、ウサギ抗ヤギIgG(Organon \*50

\*Teknika)を用いて検出した。結果は、レーザースキャニングコンフォーカルイメージングシステムM RC-1000(Bio-Rad)を使って記録した。

【0076】結果を図3に示す。その結果、短いロッド・ドメインとヒンジ1と4の両方を持つ短縮型ジストロフィン(ΔDysAX2, AX11, AH3及びM3)が、効果的に形質膜に局在できることを示唆している。ΔDysH1に見られるヒンジ4の矢印は、形質膜への局在を大きく減少させる結果となった。

【0077】実施例5(形質膜におけるジストロフィン結合蛋白質の発現回復)

ジストロフィン-DAP複合体を形成するための鍵分子としてのジストロフィンの機能を評価するために、AxCAΔDysを導入後のm d x骨格筋の形質膜におけるDAPsの発現を調べた。m d x骨格筋では、DAPsの発現が減少している(オーレンディックら、ジャーナルオブセルバイオジー、115巻、1685-1694頁(1991年)[Ohlendieck, K. and Campbell, K.P. (1991) J. Cell Biol. 115, 1685-1694.]) (図4参照)のに対して、AxCAΔDysH1以外のAxCAΔDysを導入した骨格筋では、ジストロフィン陽性線維においてDAPsの形質膜での発現が、著しく回復した。

【0078】実施例6(新生仔m d xマウス骨格筋に対するインビボ(in vivo)遺伝子導入)

生後1週のm d xマウス一側後肢の腓腹筋中央部に、AxCAΔDysM3とAxCALacZの混合物6 μlを直接導入した。4週間後、後肢の腓腹筋部の骨格筋を取り出し、H&E染色、X-Ga1染色及びジストロフィン染色を行った。この結果、アデノウイルスを注入した側の後肢の腓腹筋群について、アデノウイルスベクターの導入を確認するために、X-Ga1染色を行うと、腓腹筋群のうち浅指屈筋(flexor digitorum superficialis)において、最も高率に、遺伝子を導入されている線維が認められた。このβ-Ga1陽性領域についてジストロフィンの免疫染色を行ったところ、ほとんどの線維においてジストロフィンが発現していた。同部分について、H&E染色を行って詳しく観察したところ、非導入側の浅指屈筋(flexor digitorum superficialis)と

23

比較して、筋の変性・壊死像及び中心核線維数が著しく減少していた。

【0079】

【発明の効果】本発明の遺伝子及び筋ジストロフィーの遺伝子治療用の遺伝子導入媒体を用いることにより、よ\*

配列番号：1

配列の長さ：3748

配列の型：核酸

鎖の数：両形態（both）

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列の特徴：active-site

配列

CGGCCTCT AGAGGATCCC CGGGTACCGA GCTGAATTG CGGAACCTCC GGAGAAAAAC	60
GAATAGAAA AACTGAAGTG TTACTTTTT TAAAGCTGCT GAAGTTGTT GTTTCTCAT	120
TGTTTTAAG CCTACTGGAG CAATAAAGTT TGAAGAACCT TTACCAAGTT TTTTTATCG	180
CTGCCTGAT ATACATTTT CAAAATGCTT TGGTGGGAAG AAGTAGAGGA CTGTTATGAA	240
AGAGAAGATG TTCAAAAGAA AACATTCAAA AAATGGGAA ATGCACAATT TTCTAAGTTT	300
GGGAAGCAGC ATATTGAGAA CCTCTTCACTG GACCTACAGG ATGGGAGGGCG CCTCCTAGAC	360
CTCCTCGAAG GCCTGACAGG GCAAAACTG CCAAAAGAAA AAGGATCCAC AAGAGTTCAT	420
GCCCTGAACA ATGTCACAA GGCACCTGGG GTTTGAGCA ACAATAATGT TGATTTAGTG	480
AATATTGGAA GTACTGACAT CGTAGATGGA AATCATAAAC TGACTCTGG TTGATTGG	540
AATATAATCC TCCACTGGCA GGTCAAAAT GTATGAAAA ATATCATGGC TGATTGCAA	600
CAAACCAACA GTGAAAAGAT TCTCTGAGC TGGGTCGAC AATCAACTCG TAATTATCCA	660
CAGGTTAATG TAATCAACTT CACCACCGC TGGCTGATG GCCTGGCTT GAATGCTTC	720
ATCCATAGTC ATAGGCCAGA CCTATTGAC TGGAAATAGTG TGGTTGCCA GCAGTCAGCC	780
ACACAAACGAC TGGAAACATGC ATTCAACATC GCCAGATATC AATTAGGCAT AGAGAAAATA	840
CTCGATCTG AAGATGTTA TACCACTAT CCAGATAAGA AGTCCATCTT AATGTACATC	900
ACATCACTCT TCCAAGTTT GCCTAACAAA GTGAGCATTG AAGCCATCCA GGAAGTGGAA	960
ATGTTGCCA GCCCACCTAA AGTCACTAA GAAGAACATT TTCACTTACA TCATCAAATG	1020
CACTATTCTC AACAGATCAC GGTCACTGTA GCACAGGGAT ATGAGAGAAC TTCTTCCCCT	1080
AAGCTCGAT TCAAGAGCTA TGCTTACACA CAGGCTGCTT ATGTCACCCAC CTCTGACCCCT	1140
ACACGGAGCC CATTCTCTC ACAGCATTG GAAGCTCCTG AAGACAAGTC ATTTGGCAGT	1200
TCATTGATGG AGAGTGAAGT AAACCTGGAC CGTTATCAA CAGCTTAGA AGAAGTATTA	1260
 TGTGGCTTC TTCTGCTGA GGACACATTG CAAGCACAAG GAGAGATTG TAATGATGTG	1320
GAAGTGGTGA AAGACCAGT TCATACTCAT GAGGGTACA TGATGATT GACAGCCAT	1380
CAGGGCCGGG TTGGTAATAT TCTACAATTG GGAAGTAAGC TGATGGAAAC AGGAAAATTA	1440
TCAGAAGATG AAGAAACTGA AGTACAAGAG CAGATGAATC TCCTAAATTC AAGATGGAAAG	1500
CTTCTGCAGG TGGCGCTCGA GGACCGAGTC AGGCAGCTGC ATGAAGCCCA CAGGGACTTT	1560
GGTCAGCAT CTCACTT TCTTCCACG TCTGTCAGG GTCCCTGGGA GAGGCCATC	1620
TGCCCCAAACA AAGTGCCTTA CTATATCAAC CACGAGACTC AAACAACCTG CTGGGACCAT	1680
CCCAAAATGA CAGAGCTCTA CCAGCTTTA GCTGACCTGA ATAATGTCAG ATTCTCAGCT	1740
TATAGGACTG CCATGAAACT CCCAAGACTG CAGAAGGCC TTTGCTTGGA TCTCTTGAGC	1800
CTGTCACTG CATGTGATGC CTGGACCAAG CACAACTCA AGCAAAATGA CCAGCCATG	1860
GATATCCTGC AGATTTAA TTGTTGACC ACTATTATG ACCGCCTGGA GCAAGAGCAC	1920
AACAATTGG TCAACGTCCTC TCTCTGCGTG GATATGTC TGAACTGGCT GCTGAATGTT	1980
TATGATACGG GAGGAACAGG GAGGATCGT GTCTGCTT TTAAAGCTGG CATCATTCC	2040
CTGTGAAAG CACATTGGAA AGACAAGTAC AGATACCTT TCAAGCAAGT GGCAAGTTCA	2100
ACAGGATTTT GTGACCAAGCG CAGGCTGGGC CTCTCTGC ATGATTCTAT CAAATTCCA	2160

25

AGACAGTTGG GTGAAAGTTGC ATCCTTTGGG GGCAGTAACA TTGAGCCAAG TGTCCGGAGC	2220
TGCTTCAAT TTGCTATAA TAAGCCAGAG ATCGAAGCGG CCCTCTTCCT AGACTGGATG	2280
AGACTGGAA CCCAGTCCAT GGTGTGGCTG CCCGTCTGC ACAGAGTGGC TGCTGCAGAA	2340
ACTGCCAAC ATCAGGCCAA ATGTAACATC TGCAAAGAGT GTCCAATCAT TGGATTCAAGG	2400
TACAGGAGTC TAAAGCACTT TAATTATGAC ATCTGCCAA GCTGCTTTT TTCTGGTCGA	2460
GTTGCAAAAG GCCATAAAAT GCACTATCCC ATGGTGAAT ATTGCACTCC GACTACATCA	2520
GGAGAAGATG TTGAGACTT TGCCAAGGT AAAAAAACAA ATTTCGAAC CAAAGGTAT	2580
TTTGCGAAGC ATCCCCGAAT GGGCTACCTG CCAGTGCAGA CTGCTTCTAGA GGGGGACAC	2640
ATGGAACATC CCGTTACTCT GATCAACTTC TGCCAGTAG ATTCTGCGCC TGCGCTCGTCC	2700
CCTCAGCTT CACACATGA TACTCATTCA CGCATTGAAC ATTATGCTAG CAGGCTAGCA	2760
GAAATGAAA ACAGCAATGG ATCTTATCTA AATGATAGCA TCTCTCTAA TGAGAGCATA	2820
GATGATGAAC ATTTGTTAAT CCAGCATTAC TGCCAAAGTT TGAACCAGGA CTCCCCCTG	2880
AGCCAGCCTC GTAGTCTGC CCAGATCTG ATTTCTCTAG AGAGTGAGGA AAGAGGGAG	2940
CTAGAGAGAA TCCTAGCAGA TCTTGAGGAA GAAAACAGGA ATCTGCAAGC AGAATATGAC	3000
CGTCTAAAGC AGCAGCACGA ACATAAGGC CTGTCCTCCAC TGCCGTCCCC TCCTGAAATG	3060
ATGCCACCT CTCCCCAGAG TCCCCGGGAT GCTGAGCTCA TTGCTGAGGC CAAGCTACTG	3120
CGTCAACAC AAAGGCCGCC TGGAAGCCAG GATGCAAATC CTGGAAGACCC ACAATAAACAG	3180
CTGGAGCTCA CAGTTACACA GGCTAAGGC GCTGCTGGAG CAACCCAGG CAGAGGCCAAA	3240
GTGAATGGC ACAACGGTGT CCTCTCTTC TACCTCTCTA CAGAGGTCG ACAGCAGTCAG	3300
CCTATGCTG CTCCGAGTGG TTGGCAGTCA AACTTCGGAC TCCATGGGTG AGGAAGATCTT	3360
CTCAGTCCT CCCCCAGGACA CAAGCACAGG GTTAGAGGGAG GTGATGGAGC AACTCAACAAC	3420
TCCCTCTT AGTTCAAGAG GAAGAAATAC CCCTGAAAG CCAATGAGAG AGGACACAAATG	3480
TAGGAAGTC TTTTCCACAT GGCAGATGAT TTGGCAGAG CGATGGAGTC CTTAGTATCAG	3540
TCATGACAG ATGAAGAAGG AGCAGAATAA ATGTTTACA ACTCCTGATT CCCGCATGGTT	3600
TTTATAATA TTCATACAAC AAAGAGGATT AGACAGTAAG AGTTTACAAG AAATAATCTA	3660
TATTTTGT GAAGGGTAGT GGTATTATAC TGTAGATTTC AGTAGTTCT AAGTCTGTTAT	3720
GTTTGTG GGGATCTCT AGAGTCGA	3748

配列番号：2

配列の長さ：1092

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列

Met Leu Trp Trp Glu Glu Val Glu Asp Cys Tyr Glu Arg Glu Asp	15
Val Gln Lys Lys Thr Phe Thr Lys Trp Val Asn Ala Gln Phe Ser	30
Lys Phe Gly Lys Gln His Ile Glu Asn Leu Phe Ser Asp Leu Gln	45
Asp Gly Arg Arg Leu Leu Asp Leu Leu Glu Gly Leu Thr Gly Gln	60
Lys Leu Pro Lys Glu Lys Gly Ser Thr Arg Val His Ala Leu Asn	75
Asn Val Asn Lys Ala Leu Arg Val Leu Gln Asn Asn Asn Val Asp	90
Leu Val Asn Ile Gly Ser Thr Asp Ile Val Asp GlyA sn His Lys	105
Leu Thr Leu Gly Leu Ile Trp Asn Ile Ile Leu His Trp Gln Val	120
Lys Asn Val Met Lys Asn Ile Met Ala Gly Leu Gln Gln Thr Asn	135
Ser Glu Lys Ile Leu Leu Ser Trp Val Arg Gln Ser Thr Arg Asn	150
Tyr Pro Gln Val Asn Val Ile Asn Phe Thr Thr Ser Trp Ser Asp	165
Gly Leu Ala Leu Asn Ala Leu Ile His Ser His Arg Pro Asp Leu	180
Phe Asp Trp Asn Ser Val Val Cys Gln Gln Ser Ala Thr Gln Arg	195
Leu Glu His Ala Phe Asn Ile Ala Arg Tyr Gln Leu Gly Ile Glu	210
Lys Leu Leu Asp Pro Glu Asp Val Asp Thr Thr Tyr Pro Asp Lys	225

27

Lys Ser Ile Leu Met Tyr Ile Thr Ser Leu Phe Gln Val Leu Pro	240
Gln Gln Val Ser Ile Glu Ala Ile Gln Glu Val Glu Met Leu Pro	255
Arg Pro Pro Lys Val Thr Lys Glu Glu His Phe Gln Leu His His	270
Gln Met His Tyr Ser Gln Gln Ile Thr Val Ser Leu Ala Gln Gly	285
Tyr Glu Arg Thr Ser Ser Pro Lys Pro Arg Phe Lys Ser Tyr Ala	300
Tyr Thr Gln Ala Ala Tyr Val Thr Thr Ser Asp Pro Thr Arg Ser	315
Pro Phe Pro Ser Gln His Leu Glu Ala Pro Glu Asp Lys Ser Phe	330
Gly Ser Ser Leu Met Glu Ser Glu Val Asn Leu Asp Arg Tyr Gln	345
Thr Ala Leu Glu Glu Val Leu Ser Trp Leu Leu Ser Ala Glu Asp	360
Thr Leu Gln Ala Gln Gly Glu Ile Ser Asn Asp Val Glu Val Val	375
Lys Asp Gln Phe His Thr His Glu Gly Tyr Met Met Asp Leu Thr	390
Ala His Gln Gly Arg Val Gly Asn Ile Leu Gln Leu Gly Ser Lys	405
Leu Ile Gly Thr Gly Lys Leu Ser Glu Asp Glu Glu Thr Glu Val	420
Gln Glu Gln Met Asn Leu Leu Asn Ser Arg Trp Lys Leu Leu Gln	435
Val Ala Val Glu Asp Arg Val Arg Gln Leu His Glu Ala His Arg	450
Asp Phe Gly Pro Ala Ser Gln His Phe Leu Ser Thr Ser Val Gln	465
Gly Pro Trp Glu Arg Ala Ile Ser Pro Asn Lys Val Pro Tyr Tyr	480
Ile Asn His Glu Thr Gln Thr Cys Trp Asp His Pro Lys Met	495
Thr Glu Leu Tyr Gln Ser Leu Ala Asp Leu Asn Asn Val Arg Phe	510
Ser Ala Tyr Arg Thr Ala Met Lys Leu Arg Arg Leu Gln Lys Ala	525
Leu Cys Leu Asp Leu Leu Ser Leu Ser Ala Ala Cys Asp Ala Leu	540
Asp Gln His Asn Leu Lys Gln Asn Asp Gln Pro Met Asp Ile Leu	555
Gln Ile Ile Asn Cys Leu Thr Thr Ile Tyr Asp Arg Leu Glu Gln	570
Glu His Asn Asn Leu Val Asn Val Pro Leu Cys Val Asp Met Cys	585
Leu Asn Trp Leu Leu Asn Val Tyr Asp Thr Gly Arg Thr Gly Arg	600
Ile Arg Val Leu Ser Phe Lys Thr Gly Ile Ile Ser Leu Cys Lys	615
Ala His Leu Glu Asp Lys Tyr Arg Tyr Leu Phe Lys Gln Val Ala	630
Ser Ser Thr Gly Phe Cys Asp Gln Arg Arg Leu Gly Leu Leu Leu	645
His Asp Ser Ile Gln Ile Pro Arg Gln Leu Gly Glu Val Ala Ser	660
Phe Gly Gly Ser Asn Ile Glu Pro Ser Val Arg Ser Cys Phe Gln	675
Phe Ala Asn Asn Lys Pro Glu Ile Glu Ala Ala Leu Phe Leu Asp	690
Trp Met Arg Leu Glu Pro Gln Ser Met Val Trp Leu Pro Val Leu	705
His Arg Val Ala Ala Ala Glu Thr Ala Lys His Gln Ala Lys Cys	720
Asn Ile Cys Lys Glu Cys Pro Ile Ile Gly Phe Arg Tyr Arg Ser	735
Leu Lys His Phe Asn Tyr Asp Ile Cys Gln Ser Cys Phe Phe Ser	750
Gly Arg Val Ala Lys Gly His Lys Met His Tyr Pro Met Val Glu	765
Tyr Cys Thr Pro Thr Ser Gly Glu Asp Val Arg Asp Phe Ala	780
Lys Val Leu Lys Asn Lys Phe Arg Thr Lys Arg Tyr Phe Ala Lys	795
His Pro Arg Met Gly Tyr Leu Pro Val Gln Thr Val Leu Glu Gly	810
Asp Asn Met Glu Thr Pro Val Thr Leu Ile Asn Phe Trp Pro Val	825
Asp Ser Ala Pro Ala Ser Ser Pro Gln Leu Ser His Asp Asp Thr	840
His Ser Arg Ile Glu His Tyr Ala Ser Arg Leu Ala Glu Met Glu	855
Asn Ser Asn Gly Ser Tyr Leu Asn Asp Ser Ile Ser Pro Asn Glu	870
Ser Ile Asp Asp Glu His Leu Leu Ile Gln His Tyr Cys Gln Ser	885
Leu Asn Gln Asp Ser Pro Leu Ser Gln Pro Arg Ser Pro Ala Gln	900
Ile Leu Ile Ser Leu Glu Ser Glu Glu Arg Gly Glu Leu Glu Arg	915
Ile Leu Ala Asp Leu Glu Glu Asn Arg Asn Leu Gln Ala Glu	930
Tyr Asp Arg Leu Lys Gln His Glu His Lys Gly Leu Ser Pro	945
Leu Pro Ser Pro Pro Glu Met Met Pro Thr Ser Pro Gln Ser Pro	960

29

Arg Asp Ala Glu Leu Ile Ala Glu Ala Lys Leu Leu Arg Gln His	975
Lys Gly Arg Leu Glu Ala Arg Met Gln Ile Leu Glu Asp His Asn	990
Lys Gln Leu Glu Ser Gln Leu His Arg Leu Arg Gln Leu Leu Glu	1005
Gln Pro Gln Ala Glu Ala Lys Val Asn Gly Thr Thr Val Ser Ser	1020
Pro Ser Thr Ser Leu Gln Arg Ser Asp Ser Ser Gln Pro Met Leu	1035
Leu Arg Val Val Gly Ser Gln Thr Ser Asp Ser Met Gly Glu Glu	1050

Asp Leu Leu Ser Pro Pro Gln Asp Thr Ser Thr Gly Leu Glu Glu	1065
Val Met Glu Gln Leu Asn Asn Ser Phe Pro Ser Ser Arg Gly Arg	1080
Asn Thr Pro Gly Lys Pro Met Arg Glu Asp Thr Met	1092

配列番号: 3

配列の長さ: 4402

配列の型: 核酸

鎖の数: 両形態 (both)

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

配列の特徴: active-site

配列

CGGCCGCTCT AGAGGATCCC CGGGTACCGA GCTCGAATTG CGGAACCTCCC GGAGAAAAAC	60
GAATAGAAA AACTGAAGTG TTACTTTTTT TAAAGCTGCT GAACTTGTGTT GGTTCAT	120
TGTTTTAAG CCTACTGGAG CAATAAGTT TGAAGAACTT TTACCAAGTT TTTTTATCG	180
CTGCCTTGAT ATACATTTT CAAAATGCTT TGGTGGGAAG AAGTAGAGGA CTGTTATGAA	240
AGAGAAGATG TTCAAAAGAA AACATTCACA AAATGGGAAATG CACAATT TTCTAAGTTT	300
GGGAAGCAGC ATATTGAGAA CCTCTTCAGT GACCTACAGG ATGGGAGGCG CCTCCTAGAC	360
CTCCTCGAAG GCCTGACAGG GCAAAACTG CCAAAAGAAA AAGGATCCAC AAGAGTTCAT	420
GCCCTGAACA ATGTCACAA GGCACATGCGG GTTTGCAGA ACAATAATGT TGATTTAGTG	480
AATATTGAA GTACTGACAT CGTAGATGGA AATCATAAAC TGACTCTGG TTGATTGG	540
AATATAATCC TCCACTGGCA GGTCAAAAT GTAATGAAA ATATCATGGC TGATTGCAA	600
CAAACCAACA GTGAAAAGAT TCTCTGAGC TGGGTCCGAC AATCAACTCG TAATTATCCA	660
CAGTTAATG TAATCAACTT CACCAACAGC TGGCTGATG GCTGGCTTT GAATGCTCTC	720
ATCCATAGTC ATAGGCCAGA CCTATTGAC TGGAAATAGTG TGGTTGCCA GCAGTCAGCC	780
ACACAAACGAC TGGAAACATGC ATTCAACATC GCCAGATATC AATTAGGCAT AGAGAAACTA	840
CTCGATCTG AAGATGTTGA TACCACTAT CCAGATAAGA AGTCCATCTT AATGTACATC	900
ACATCACTCT TCCAAGTTT GCCTCAACAA GTGAGCATTG AAGCCATCCA GGAAGTGGAA	960
ATGTTGCCAA GCCCACCTAA AGTCACTAAA GAAGAACATT TTCAGTTACA TCATCAAATG	1020
CACTATTCTC AACAGATCAC GGTCACTCTA GCACAGGGAT ATGAGAGAAC TTCTTCCCCT	1080
AAGCTCGAT TCAAGAGCTA TGCTCACACA CAGGCTGCTT ATGTCACAC CTCGACCCCT	1140
ACACGGAGCC CATTTCCTTC ACAGCAATTG GAAGCTCCTG AAGACAAGTC ATTGGCAGT	1200
TCATTGATGG AGAGTGAAGT AAACCTGGAC CGTTATCAA CAGCTTAGA AGAAGTATTA	1260

TGTTGGCTTC TTTCTGCTGA GGACACATTG CAAGCACAAG GAGAGATTC TAATGATGTG	1320
GAAGTGGTGA AAGACCAGTT TCATACTCAT GAGGGTACA TGATGGATTG TACAGCCCAT	1380
CAGGCCGGG TTGTTAATAT TCTACAATTTG GGAAGTAAGC TGATTGGAC AGGAAAATTA	1440
TCAGAAAGATG AAGAAACTGA AGTACAAGAG CAGATGAATC TCCTAAATTG AAGATGGAA	1500
TGCCTCAGGG TAGCTAGCAT GGAAAAACAA AGCAATTAC ATAGAGTTT AATGGATCTC	1560
CAGAATCAGA AACTGAAAGA GTTGAATGAC TGGCTAACAA AAACAGAAGA AGAACAGG	1620
AAAATGGAGG AAGACCTCT TGGACCTGAT CTGAAAGACC TAAACGCCA AGTACAACAA	1680
CATAAGGTGC TTCAAGAAGA TCTAGAACAA GAACAAGTCA GGGTCAATTCT CTCACTCAC	1740
ATGGTGGTGG TAGTTGATGA ATCTAGTGGA GATCACGCAA CTGCTGTTTG GAAGAACAA	1800
CTTAAAGGAGG TCAATACTGA GTGGGAAAAA TTGAACCTGC ACTCCGCTGAC TGGCAGAGA	1860

31

AAAATAGATG AGACCTTGA AAGACTCCAG GAACTCAAG AGGCCACGGAT GAGCTGGAC	1920
CTCAAGCTGC GCCAAGCTGA GGTGATCAAG GGATCTGGC AGCCCGGGC GATCTCCTC	1980
ATTGACTCTC TCCAAGATCA CCTCGAGAAA GTCAAGGCAC TTGAGGAGAA ATTGGCCT	2040
CTGAAAGAGA ACGTGAGCCA CGTCAATGAC CTTGCTGCC AGCTTACCACT TTGGCATT	2100
CAGCTCTCAC CGTATAACCT CAGCACTCTG GAAGACCTGA ACACCAAGATGG AAGCTTCTG	2160
CAGGTGGCCG TCGAGGACCG AGTCAGGCAG CTGCATGAAG CCCACAGGGAC TTGGTCCA	2220
GCATCTCAGC ACTTTCTTC CACGCTGTC CAGGGCCCT GGGGAGAGGCC ATCTGCCA	2280
AACAAAGTGC CCTACTATAT CAACCAAGAG ACTCAAACAA CTTGCTGGAC CATCCAAA	2340
ATGACAGAGC TCTACCAAGTC TTTAGCTGAC CTGAATAATG TCAGATTCTCA GCTTATAGG	2400
ACTGCCATGA AACTCGAAG ACTTGAGAAG GCCCTTGCT TGGATCTCTG AGCCTGTCA	2460
GCTGCGATGTG ATGCTTGGA CCAGCACAAC CTCAAGCAAA ATGACCAGCCC ATGGATATC	2520
CTGCAGATTA TTAATTGTTT GACCACTATT TATGACGCC TGGAGCAAGAG CACAACAAT	2580
TTGGTCACAG TCCCTCTG CGTGGATATG TGTCTGAACG GGCTGCTGAAT GTTTATGAT	2640
ACGGGACGAA CAGGGAGGAT CGGTGCTTG TCTTTAAAA CTGGCATCATT TCCCTGTGT	2700
AAAGCACATT TGGAGACAA GTACAGATAC CTTTCAAGC AAGTGGCAAGT TCAACAGGA	2760
TTTTGTGACC AGCGCAGGCT GGGCCCTCTT CTGCATGATT CTATCCAAATT CCAAGACAG	2820
TTGGGTGAAG TTGCGATCCTT TGGGGCAGT AACATTGAGC CAAGTGTCCGG AGCTGCTTC	2880
CAATTGCTA ATAATAAGCC AGAGATCGAA GGGCCCTCT TCCCTAGACTGG ATGAGACTG	2940
GAACCCAGT CCATGGTGTG GCTGCCGTC CTGCACAGAG TGGCTGCTGCA GAAACTGCC	3000
 AAGCATCAGG CCAAATGTA CATCTGCAA GAGTGTCCAA TCATTGGATT AGGTACAGG	3060
AGTCTAAAGC ACTTTAATTA TGACATCTGC CAAAGCTGCT TTTTTCTGGT CGAGTTGCA	3120
AAAGGCCATA AAATGCACTA TCCCCTGGT GAATATTGCA CTCCGACTACA TCAGGAGAA	3180
GATGTTGAG ACTTTGCCAA GGTACTAAAA AACAAATTTC GAACCAAAAGG TATTTTGCG	3240
AAGCATCCCC GAATGGGCTA CCTGCCAGTG CAGACTGTCT TAGAGGGGGAC AACATGGAA	3300
ACTCCCGTTA CTCTGATCAA CTTCTGGCCA GTAGATTCTG CGCCTGCCTCG TCCCCTCAG	3360
CTTCACACG ATGATACTCA TTCAAGCATT GAACATTATG CTAGCAGGCTA GCAGAAATG	3420
GAAAACAGCA ATGGATCTTA TCTAAATGAT AGCATCTCTC CTAATGAGAGC ATAGATGAT	3480
GAACATTGT TAATCCAGCA TTACTGCCAA AGTTGAACC AGGACTCCCCC CTGAGCCAG	3540
CCTCGTAGTC CTGCCAGAT CTTGATTTC TTAGAGAGTG AGGAAGAGGG GAGCTAGAG	3600
AGAATCCTAG CAGATCTGA GGAAGAAAAG AGGAATCTGC AAGCAGAATAT GACCGTCTA	3660
AAGCAGCAGC AGCAACATAA AGGCCGTGTC CCACGCGCT CCCCTCTGAA ATGATGCC	3720
ACCTCTCCCC AGAGTCCCCG GGATGCTGAG CTCAATTGCTG AGGCCAGCTA CTGCGTCAA	3780
CACAAAGGCC GCCTGGAAGC CAGGATGCAA ATCCTGGAAG ACCACAATAAA CAGCTGGAG	3840
TCACAGTTAC ACAGGCTAAG CGAGCTGCTG GAGCAACCCC AGGCAGAGGCC AAAGTGAAT	3900
GGCACACAGG TGTCTCTCC TTCTACCTCT CTACAGAGGT CGCACAGCAGT CAGCCTATG	3960
CTGCTCGAG TGGTGGCG TCAAACATTG GACTCCATGG GTGAGGAAGAT CTTCTCAGT	4020
CCTCCCCAGG ACACAAGCAC AGGGTTAGAG GAGGTGATGG AGCAACTCAAC AACTCCTTC	4080
CCTAGTTCAA GAGGAAGAAA TACCCCTGGA AAGCCAATGA GAGAGGACACA ATGTTAGGAA	4140
GTCTTTCCA CATGGCAGAT GATTGGGCA GAGCGATGGA GTCTTAGTAT CAGTCATGA	4200
CAGATGAAGA AGGAGCAGAA TAAATGTTT ACAACTCTG ATTCCCGATG GTTTTATA	4260
ATATTCTACAT AACAAAGAGG ATTAGACAGT AAGAGTTTAC AAGAAATAAT CTATATT	4320
TGTGAGGGT AGTGGTATTA TACTGTAGAT TTCAAGTCTGT TATTGTTT	4380
GTTGGGGATC CTCTAGAGTC GA	4402

配列番号：4

配列の長さ：1310

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列

33

Met Leu Trp Trp Glu Glu Val Glu Asp Cys Tyr Glu Arg Glu Asp	15
Val Gln Lys Lys Thr Phe Thr Lys Trp Val Asn Ala Gln Phe Ser	30
Lys Phe Gly Lys Gln His Ile Glu Asn Leu Phe Ser Asp Leu Gln	45
Asp Gly Arg Arg Leu Leu Asp Leu Leu Glu Gly Leu Thr Gly Gln	60
Lys Leu Pro Lys Glu Lys Gly Ser Thr Arg Val His Ala Leu Asn	75
Asn Val Asn Lys Ala Leu Arg Val Leu Gln Asn Asn Asn Val Asp	90
Leu Val Asn Ile Gly Ser Thr Asp Ile Val Asp Gly Asn His Lys	105
Leu Thr Leu Gly Leu Ile Trp Asn Ile Ile Leu His Trp Gln Val	120
Lys Asn Val Met Lys Asn Ile Met Ala Gly Leu Gln Gln Thr Asn	135
Ser Glu Lys Ile Leu Leu Ser Trp Val Arg Gln Ser Thr Arg Asn	150
Tyr Pro Gln Val Asn Val Ile Asn Phe Thr Thr Ser Trp Ser Asp	165
Gly Leu Ala Leu Asn Ala Leu Ile His Ser His Arg Pro Asp Leu	180
Phe Asp Trp Asn Ser Val Val Cys Gln Gln Ser Ala Thr Gln Arg	195
Leu Glu His Ala Phe Asn Ile Ala Arg Tyr Gln Leu Gly Ile Glu	210
Lys Leu Leu Asp Pro Glu Asp Val Asp Thr Thr Tyr Pro Asp Lys	225
Lys Ser Ile Leu Met Tyr Ile Thr Ser Leu Phe Gln Val Leu Pro	240
Gln Gln Val Ser Ile Glu Ala Ile Gln Glu Val Glu Met Leu Pro	255
Arg Pro Pro Lys Val Thr Lys Glu Glu His Phe Gln Leu His His	270
Gln Met His Tyr Ser Gln Gln Ile Thr Val Ser Leu Ala Gln Gly	285
Tyr Glu Arg Thr Ser Ser Pro Lys Pro Arg Phe Lys Ser Tyr Ala	300
Tyr Thr Gln Ala Ala Tyr Val Thr Thr Ser Asp Pro Thr Arg Ser	315
Pro Phe Pro Ser Gln His Leu Glu Ala Pro Glu Asp Lys Ser Phe	330
Gly Ser Ser Leu Met Glu Ser Glu Val Asn Leu Asp Arg Tyr Gln	345
Thr Ala Leu Glu Glu Val Leu Ser Trp Leu Leu Ser Ala Glu Asp	360
Thr Leu Gln Ala Gln Gly Glu Ile Ser Asn Asp Val Glu Val Val	375
Lys Asp Gln Phe His Thr His Glu Gly Tyr Met Met Asp Leu Thr	390
Ala His Gln Gly Arg Val Gly Asn Ile Leu Gln Leu Gly Ser Lys	405
Leu Ile Gly Thr Gly Lys Leu Ser Glu Asp Glu Glu Thr Glu Val	420
Gln Glu Gln Met Asn Leu Leu Asn Ser Arg Trp Glu Cys Leu Arg	435
Val Ala Ser Met Glu Lys Gln Ser Asn Leu His Arg Val Leu Met	450
Asp Leu Gln Asn Gln Lys Leu Lys Glu Leu Asn Asp Trp Leu Thr	465
Lys Thr Glu Glu Arg Thr Arg Lys Met Glu Glu Glu Pro Leu Gly	480
Pro Asp Leu Glu Asp Leu Lys Arg Gln Val Gln Gln His Lys Val	495
Leu Gln Glu Asp Leu Glu Gln Glu Gln Val Arg Val Asn Ser Leu	510
Thr His Met Val Val Val Val Asp Glu Ser Ser Gly Asp His Ala	525

Thr Ala Ala Leu Glu Glu Gln Leu Lys Glu Val Asn Thr Glu Trp	540
Glu Lys Leu Asn Leu His Ser Ala Asp Trp Gln Arg Lys Ile Asp	555
Glu Thr Leu Glu Arg Leu Gln Glu Leu Gln Glu Ala Thr Asp Glu	570
Leu Asp Leu Lys Leu Arg Gln Ala Glu Val Ile Lys Gly Ser Trp	585
Gln Pro Val Gly Asp Leu Leu Ile Asp Ser Leu Gln Asp His Leu	600
Glu Lys Val Lys Ala Leu Arg Gly Glu Ile Ala Pro Leu Lys Glu	615
Asn Val Ser His Val Asn Asp Leu Ala Arg Gln Leu Thr Thr Leu	630
Gly Ile Gln Leu Ser Pro Tyr Asn Leu Ser Thr Leu Glu Asp Leu	645
Asn Thr Arg Trp Lys Leu Leu Gln Val Ala Val Glu Asp Arg Val	660
Arg Gln Leu His Glu Ala His Arg Asp Phe Gly Pro Ala Ser Gln	675
His Phe Leu Ser Thr Ser Val Gln Gly Pro Trp Glu Arg Ala Ile	690
Ser Pro Asn Lys Val Pro Tyr Tyr Ile Asn His Glu Thr Gln Thr	705
Thr Cys Trp Asp His Pro Lys Met Thr Glu Leu Tyr Gln Ser Leu	720
Ala Asp Leu Asn Asn Val Arg Phe Ser Ala Tyr Arg Thr Ala Met	735
Lys Leu Arg Arg Leu Gln Lys Ala Leu Cys Leu Asp Leu Leu Ser	750
Leu Ser Ala Ala Cys Asp Ala Leu Asp Gln His Asn Leu Lys Gln	765
Asn Asp Gln Pro Met Asp Ile Leu Gln Ile Ile Asn Cys Leu Thr	780
Thr Ile Tyr Asp Arg Leu Glu Gln Glu His Asn Asn Leu Val Asn	795
Val Pro Leu Cys Val Asp Met Cys Leu Asn Trp Leu Leu Asn Val	810
Tyr Asp Thr Gly Arg Thr Gly Arg Ile Arg Val Leu Ser Phe Lys	825
Thr Gly Ile Ile Ser Leu Cys Lys Ala His Leu Glu Asp Lys Tyr	840
Arg Tyr Leu Phe Lys Gln Val Ala Ser Ser Thr Gly Phe Cys Asp	855
Gln Arg Arg Leu Gly Leu Leu His Asp Ser Ile Gln Ile Pro	870
Arg Gln Leu Gly Glu Val Ala Ser Phe Gly Gly Ser Asn Ile Glu	885
Pro Ser Val Arg Ser Cys Phe Gln Phe Ala Asn Asn Lys Pro Glu	900
Ile Glu Ala Ala Leu Phe Leu Asp Trp Met Arg Leu Glu Pro Gln	915

Ser Met Val Trp Leu Pro Val Leu His Arg Val Ala Ala Ala Glu	930
Thr Ala Lys His Gln Ala Lys Cys Asn Ile Cys Lys Glu Cys Pro	945
Ile Ile Gly Phe Arg Tyr Arg Ser Leu Lys His Phe Asn Tyr Asp	960
Ile Cys Gln Ser Cys Phe Phe Ser Gly Arg Val Ala Lys Gly His	975
Lys Met His Tyr Pro Met Val Glu Tyr Cys Thr Pro Thr Thr Ser	990
Gly Glu Asp Val Arg Asp Phe Ala Lys Val Leu Lys Asn Lys Phe	1005
Arg Thr Lys Arg Tyr Phe Ala Lys His Pro Arg Met Gly Tyr Leu	1020
Pro Val Gln Thr Val Leu Glu Gly Asp Asn Met Glu Thr Pro Val	1035
Thr Leu Ile Asn Phe Trp Pro Val Asp Ser Ala Pro Ala Ser Ser	1050
Pro Gln Leu Ser His Asp Asp Thr His Ser Arg Ile Glu His Tyr	1065
Ala Ser Arg Leu Ala Glu Met Glu Asn Ser Asn Gly Ser Tyr Leu	1080
Asn Asp Ser Ile Ser Pro Asn Glu Ser Ile Asp Asp Glu His Leu	1095
Leu Ile Gln His Tyr Cys Gln Ser Leu Asn Gln Asp Ser Pro Leu	1110
Ser Gln Pro Arg Ser Pro Ala Gln Ile Leu Ile Ser Leu Glu Ser	1125
Glu Glu Arg Gly Glu Leu Glu Arg Ile Leu Ala Asp Leu Glu Glu	1140
Glu Asn Arg Asn Leu Gln Ala Glu Tyr Asp Arg Leu Lys Gln Gln	1155
His Glu His Lys Gly Leu Ser Pro Leu Pro Ser Pro Pro Glu Met	1170
Met Pro Thr Ser Pro Gln Ser Pro Arg Asp Ala Glu Leu Ile Ala	1185
Glu Ala Lys Leu Leu Arg Gln His Lys Gly Arg Leu Glu Ala Arg	1200
Met Gln Ile Leu Glu Asp His Asn Lys Gln Leu Glu Ser Gln Leu	1215
His Arg Leu Arg Gln Leu Leu Glu Gln Pro Gln Ala Glu Ala Lys	1230
Val Asn Gly Thr Thr Val Ser Ser Pro Ser Thr Ser Leu Gln Arg	1245
Ser Asp Ser Ser Gln Pro Met Leu Leu Arg Val Val Gly Ser Gln	1260
Thr Ser Asp Ser Met Gly Glu Glu Asp Leu Leu Ser Pro Pro Gln	1275
Asp Thr Ser Thr Gly Leu Glu Glu Val Met Glu Gln Leu Asn Asn	1290

39

Ser Phe Pro Ser Ser Arg Gly Arg Asn Thr Pro Gly Lys Pro Met 1305

Arg Glu Asp Thr Met \*\*\* 1310

配列番号: 5

配列の長さ: 4402

配列の型: 核酸

鎖の数: 両形態 (both)

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

配列の特徴: active-site

配列

CGGCCGCTCT	AGAGGATCCC	CGGGTACCGA	GCTGAATT	CGGAAC	CCC	GGAGAAA	AC	60
GAATAGGAA	AACTGAAGTG	TTACTTTTT	TAAAGCTGCT	GAAGTTGTT	GGTTTCTCAT			120
TGTTTTAAG	CCTACTGGAG	CAATAAAGTT	TGAAGAACTT	TTACCAAGGTT	TTTTTTATCG			180
CTGCCTTGAT	ATACACTTTT	CAAATGCTT	TGGTGGGAAG	AAAGTAGAGGA	CTGTTATGAA			240
AGAGAAGATG	TCAAAAGAA	AACATTCACA	AAATGGTAA	ATGCACAATT	TTCTAAGTTT			300
GGGAAGCAGC	ATATTGAGAA	CCTCTCAGT	GACCTACAGG	ATGGGGGCG	CCTCCTAGAC			360
CTCCCTGAAG	GCCTGACAGG	GCAAAACTG	CCAAAAGAAA	AAGGATCCAC	AAGAGTTCAT			420
GCCCTGAACA	ATGTCACAA	GGCACTGCGG	GTTTGCAGA	ACAATAATGT	TGATTATGTG			480
AATATTGGAA	GTACTGACAT	CGTAGATGGA	AATCATAAAC	TGACTCTTGG	TTTGATTG			540
AATATAATCC	TCCACTGGCA	GGTCAAAAT	GTAATGAAA	ATATCATGGC	TGGATTGCAA			600
CAAACCAACA	GTGAAAAGAT	TCTCTGAGC	TGGGTCGAGC	AATCAACTCG	TAATTATCCA			660
CAGGTTAATG	TAATCAACTT	CACCAACCAGC	TGGCTGATG	GCCTGGCTT	GAATGCTTC			720
ATCCATAGTC	ATAGGCCAGA	CCTATTGAC	TGGAATAGTG	TGGTTTGCCA	GCAGTCAGCC			780
ACACAAAGAC	TGGAACATGC	ATTCAACATC	GCCAGATATC	AATTAGGCAT	AGAGAAACTA			840
CTCGATCCTG	AAGATGTTGA	TACCACTTAT	CCAGATAAGA	AGTCCATCTT	AATGTACATC			900
ACATCACTCT	TCCAAGTTT	GCCTCAACAA	GTGAGCATTG	AAGCCATCCA	GGAAAGTGGAA			960
ATGTTGCCAA	GGGCCACTAA	AGTGACTAAA	GAAGAACATT	TTCAGTTACA	TCATCAAATG			1020
CACTATTCTC	AACAGATCAC	GGTCAGTCTA	GCACAGGGAT	ATGAGAGAAC	TTCTTCCCCT			1080
AAGCCTCGAT	TCAAGAGCTA	TGCCAACACA	CAGGCTGCTT	ATGTCACCAC	CTCTGACCCCT			1140
ACACGGAGCC	CATTTCTTC	ACAGCATTG	GAAGCTCCTG	AAGACAAGTC	ATTGGCAGT			1200
TCATTGATGG	AGAGTGAAGT	AAACCTGGAC	CGTTATCAA	CAGCTTTAGA	AGAAGTATT			1260
TCTGCGCTTC	TTTCTGCTGA	GGACACATTG	CAAGCACAAG	GAGAGATTTC	TAATGATGTG			1320
GAAGTGGTGA	AAGACCAAGT	TCATACTCAT	GAGGGTACA	TGATGGATT	GACAGCCCAT			1380
CAGGGCGGG	TTGGTAATAT	TCTACAATTG	GGAAGTAAGC	TGATTGGAAC	AGGAAAATTA			1440
TCAGAAGATG	AAGAAACTGA	AGTACAAGAG	CAGATGAATC	TCCTAAATT	AAGATGGAA			1500
TGCCCTAGGG	TAGCTAGCAT	GGAAAAACAA	AGCAATTAC	ATAGAGTTT	AATGGATCTC			1560
CAGAATCAGA	AACTGAAGA	GTGAAATGAC	TGGCTAACAA	AAACAGAAGA	AAAACAAGG			1620
AAAATGGAGG	AAGAGCCTCT	TGGACCTGAT	CTTGAAGACC	TAACACGCCA	AGTACAACAA			1680
CATAAGGTGC	TTCAAGAAGA	TCTAGAACAA	GAACAAGTC	GGGCTAAC	TCTCACTCAC			1740
ATGGTGGTGG	TAGTTGATGA	ATCTAGTGG	GATCACGAA	CTGCTGCTT	GGAAAGAACAA			1800
CTTAAGGTAT	TGGGAGATG	ATGGGCAAAC	ATCTGTAGAT	GGACAGAAGA	CGCTGGTT			1860
CTTTTACAAG	ACATCCTCT	CAAATGGAA	CGTCTTACTG	AAGAACAGTG	CTTTTTAGT			1920
GCATGGCTTT	CAGAAAAAGA	AGATGAGTG	AACAAAGATT	ACACAACTGG	CTTTAAAGAT			1980
CAAATGAAA	TGTTATCAAG	TCTCAGGAAA	GTCAGGAC	TTGAGGAGA	AATGGCCCT			2040
CTGAAAGAGA	ACGTGAGCCA	CGTCAATGAC	CTTGCTGCC	AGCTTACAC	TTTGGGCATT			2100
CAGCTCTCAC	CGTATAACCT	CAGCACTCTG	GAAGACCTGA	ACACCAAGATG	GAAGCTTCTG			2160
CAGGTGGCCG	TCGAGGACCG	AGTCAGGCAG	CTGCATGAAG	CCCACAGGGA	CTTGGTCCA			2220

41

GCATCTCAGC ACTTTCTTC CACGCTGTC CAGGGCCCT GGGAGAGAGC CATCTGCCA	2280
ACAAAGTGC CCTACTATAT CAACCACGAG ACTCAAACAA CTTGCTGGGA CCATCCAAA	2340
ATGACAGAGC TCTACCAGTC TTTAGCTGAC CTGAATAATG TCAGATTCTC AGCTTATAGG	2400
ACTGCCATGA AACTCGAAG ACTCGAGAAG GCCCTTGCT TGGATCTCTT GAGCCTGTCA	2460
GCTGCATGTG ATGCCCTGGA CCAGCACAACTCAAGCAAATGACCAGCC CATGGATATC	2520
CTGCAGATTA TTAATTGTTT GACCACTATT TATGACOGCC TGGAGCAAGA GCACAACAAAT	2580
TTGGTCAACG TCCCTCTG CGTGGATATG TGTCTGAACG GGCTGCTGAA TGTITATGAT	2640
ACGGGACGAA CAGGGAGGAT CCGTGTCTG TCTTTAAAAA CTGGCATCAT TTCCCTGTGT	2700
AAAGCACATT TGGAAAGACAA GTACAGATAC CTTTCAAGC AAGTGGCAAG TTCAACAGGA	2760
TTTTGTGACC AGCCAGGCT GGGCCCTCTT CTGCATGATT CTATCCAAAT TCCAAGACAG	2820
TTGGGTGAAG TTGCACTCTT TGGGGCAGT AACATTGAGC CAAGTGTCCG GAGCTGCTTC	2880
CAATTGCTA ATAATAAGCC AGAGATCGAA GGGCCCTCT TCCTAGACTG GATGAGACTG	2940
GAACCCAGT CCATGGTGTG GCTGCCGTC CTGCACAGAG TGGCTGCTGC AGAAAATGCC	3000
AAGCATCAGG CCAAATGTAACATCTGAA GAGTGTCCAA TCATTGGATT CAGGTACAGG	3060
AGTCTAAAGC ACTTAATTA TGACATCTGC CAAAGCTGCT TTTTTCTGG TCGAGTTGCA	3120
AAAGGCCATA AAATGCACTA TCCCAGGTG GAATATTGCA CTCCGACTAC ATCAGGAGAA	3180
 GATGTTGAG ACTTTGCCAA GGTACTAAAA AACAAATTTC GAACCAAAAG GTATTTGCG	3240
AAGCATCCCC GAATGGCTA CCTGCCAGTG CAGACTGTCT TAGAGGGGA CAACATGGAA	3300
ACTCCGTTA CTCTGATCAA CTTCCTGCCA GTAGATTCTG CGCTGCCCTC GTCCCCCTCAG	3360
CTTTCACACG ATGATACTCA TTACCGCATT GAACATTATG CTAGCAGGCT AGCAGAAATG	3420
GAAAACAGCA ATGGATCTTA TCTAAATGAT AGCATCTCTC CTAATGAGAG CATAGATGAT	3480
GAACATTGT TAATCCAGCA TTACTGCCAA AGTTGAAACC AGGACTCCCC CCTGAGCCAG	3540
CCTCGTAGTC CTGCCAGAT CTTGATTCC TTAGAGAGTG AGGAAAGAGG GGAGCTAGAG	3600
AGAACCTCTAG CAGATCTTGA GGAAGAAAAG AGGAATCTGC AAGCAGAATA TGACGCTTA	3660
AAGCAGCAGC ACGAACATAA AGGCCTGTC CCACCTGCCGT CCCCTCTGA AATGATGCC	3720
ACCTCTCCCC AGAGTCCCCG GGATGCTGAG CTCAATTGCTG AGGCCAAGCT ACTGCGTCAA	3780
CACAAAGGCC GCCTGGAAGC CAGGATGCAA ATCCTGGAAG ACCACAATAA ACAGCTGGAG	3840
TCACAGTTAC ACAGGCTAAAG GCAGCTGTC GAGCAACCCC AGGAGCAGGC CAAAGTGAAT	3900
GGCACAAACGG TGTCTCTCC TTCTACCTCT CTACAGAGGT CCCACAGCAG TCAGCCTATG	3960
CTGCTCGAG TGGTTGGAG TCAAACCTCG GACTCCATGG GTGAGGAAGA TCTTCTCAGT	4020
CCTCCCCAGG ACACAAAGCAC AGGGTTAGAG GAGGTGATGG AGCAACTCAA CAACTCTTC	4080
CCTAGTTAA GAGGAAGAAA TACCCCTGGA AAGCCAATGA GAGAGGACAC AATGTTAGAA	4140
GTCTTTCCA CATGGCAGAT GATTGGCA GAGCGATGGA GTCCCTAGTA TCAGTCATGA	4200
CAGATGAAGA AGGAGCAGAA TAAATGTTT ACAACTCCTG ATTCCCGCAT GGTTTTATA	4260
ATATTCTAC AACAAAGAGG ATTAGACAGT AAGAGTTAC AAGAATAAA TCTATATTTT	4320
TGTGAAGGGT AGTGGTATTA TACTGTAGAT TTCAGTAGTT TCTAAGTCTG TTATTGTTT	4380
GTTGGGGATC CTCTAGAGTC GA	4402

配列番号: 6

配列の長さ: 1310

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: タンパク質

配列

Met Leu Trp Trp Glu Glu Val Glu Asp Cys Tyr Glu Arg Glu Asp	15
Val Gln Lys Lys Thr Phe Thr Lys Trp Val Asn Ala Gln Phe Ser	30
Lys Phe Gly Lys Gln His Ile Glu Asn Leu Phe Ser Asp Leu Gln	45
Asp Gly Arg Arg Leu Leu Asp Leu Leu Glu Gly Leu Thr Gly Gln	60
 Lys Leu Pro Lys Glu Lys Gly Ser Thr Arg Val His Ala Leu Asn	75

43

Asn Val Asn Lys Ala Leu Arg Val Leu Gln Asn Asn Asn Val Asp	90
Leu Val Asn Ile Gly Ser Thr Asp Ile Val Asp Gly Asn His Lys	105
Leu Thr Leu Gly Leu Ile Trp Asn Ile Ile Leu His Trp Gln Val	120
Lys Asn Val Met Lys Asn Ile Met Ala Gly Leu Gln Gln Thr Asn	135
Ser Glu Lys Ile Leu Leu Ser Trp Val Arg Gln Ser Thr Arg Asn	150
Tyr Pro Gln Val Asn Val Ile Asn Phe Thr Thr Ser Trp Ser Asp	165
Gly Leu Ala Leu Asn Ala Leu Ile His Ser His Arg Pro Asp Leu	180
Phe Asp Trp Asn Ser Val Val Cys Gln Gln Ser Ala Thr Gln Arg	195
Leu Glu His Ala Phe Asn Ile Ala Arg Tyr Gln Leu Gly Ile Glu	210
Lys Leu Leu Asp Pro Glu Asp Val Asp Thr Thr Tyr Pro Asp Lys	225
Lys Ser Ile Leu Met Tyr Ile Thr Ser Leu Phe Gln Val Leu Pro	240
Gln Gln Val Ser Ile Glu Ala Ile Gln Glu Val Glu Met Leu Pro	255
Arg Pro Pro Lys Val Thr Lys Glu Glu His Phe Gln Leu His His	270
Gln Met His Tyr Ser Gln Gln Ile Thr Val Ser Leu Ala Gln Gly	285
Tyr Glu Arg Thr Ser Ser Pro Lys Pro Arg Phe Lys Ser Tyr Ala	300
Tyr Thr Gln Ala Ala Tyr Val Thr Thr Ser Asp Pro Thr Arg Ser	315
Pro Phe Pro Ser Gln His Leu Glu Ala Pro Glu Asp Lys Ser Phe	330
Gly Ser Ser Leu Met Glu Ser Glu Val Asn Leu Asp Arg Tyr Gln	345
Thr Ala Leu Glu Glu Val Leu Ser Trp Leu Leu Ser Ala Glu Asp	360
Thr Leu Gln Ala Gln Gly Glu Ile Ser Asn Asp Val Glu Val Val	375
Lys Asp Gln Phe His Thr His Glu Gly Tyr Met Met Asp Leu Thr	390
Ala His Gln Gly Arg Val Gly Asn Ile Leu Gln Leu Gly Ser Lys	405
Leu Ile Gly Thr Gly Lys Leu Ser Glu Asp Glu Glu Thr Glu Val	420
Gln Glu Gln Met Asn Leu Leu Asn Ser Arg Trp Glu Cys Leu Arg	435
Val Ala Ser Met Glu Lys Gln Ser Asn Leu His Arg Val Leu Met	450
Asp Leu Gln Asn Gln Lys Leu Lys Glu Leu Asn Asp Trp Leu Thr	465
Lys Thr Glu Glu Arg Thr Arg Lys Met Glu Glu Glu Pro Leu Gly	480
Pro Asp Leu Glu Asp Leu Lys Arg Gln Val Gln Gln His Lys Val	495
Leu Gln Glu Asp Leu Glu Gln Glu Gln Val Arg Val Asn Ser Leu	510
Thr His Met Val Val Val Asp Glu Ser Ser Gly Asp His Ala	525
Thr Ala Ala Leu Glu Glu Gln Leu Lys Val Leu Gly Asp Arg Trp	540
Ala Asn Ile Cys Arg Trp Thr Glu Asp Arg Trp Val Leu Leu Gln	555
Asp Ile Leu Leu Lys Trp Gln Arg Leu Thr Glu Glu Gln Cys Leu	570
Phe Ser Ala Trp Leu Ser Glu Lys Glu Asp Ala Val Asn Lys Ile	585
His Thr Thr Gly Phe Lys Asp Gln Asn Glu Met Leu Ser Ser Leu	600
Glu Lys Val Lys Ala Leu Arg Gly Glu Ile Ala Pro Leu Lys Glu	615
Asn Val Ser His Val Asn Asp Leu Ala Arg Gln Leu Thr Thr Leu	630
Gly Ile Gln Leu Ser Pro Tyr Asn Leu Ser Thr Leu Glu Asp Leu	645
Asn Thr Arg Trp Lys Leu Leu Gln Val Ala Val Glu Asp Arg Val	660
Arg Gln Leu His Glu Ala His Arg Asp Phe Gly Pro Ala Ser Gln	675
His Phe Leu Ser Thr Ser Val Gln Gly Pro Trp Glu Arg Ala Ile	690
Ser Pro Asn Lys Val Pro Tyr Tyr Ile Asn His Glu Thr Gln Thr	705
Thr Cys Trp Asp His Pro Lys Met Thr Glu Leu Tyr Gln Ser Leu	720
Ala Asp Leu Asn Asn Val Arg Phe Ser Ala Tyr Arg Thr Ala Met	735
Lys Leu Arg Arg Leu Gln Lys Ala Leu Cys Leu Asp Leu Leu Ser	750
Leu Ser Ala Ala Cys Asp Ala Leu Asp Gln His Asn Leu Lys Gln	765
Asn Asp Gln Pro Met Asp Ile Leu Gln Ile Ile Asn Cys Leu Thr	780
Thr Ile Tyr Asp Arg Leu Glu Gln Glu His Asn Asn Leu Val Asn	795
Val Pro Leu Cys Val Asp Met Cys Leu Asn Trp Leu Leu Asn Val	810

45

Tyr Asp Thr Gly Arg Thr Gly Arg Ile Arg Val Leu Ser Phe Lys	825
Thr Gly Ile Ile Ser Leu Cys Lys Ala His Leu Glu Asp Lys Tyr	840
Arg Tyr Leu Phe Lys Gln Val Ala Ser Ser Thr Gly Phe Cys Asp	855
Gln Arg Arg Leu Gly Leu Leu His Asp Ser Ile Gln Ile Pro	870
Arg Gln Leu Gly Glu Val Ala Ser Phe Gly Gly Ser Asn Ile Glu	885
Pro Ser Val Arg Ser Cys Phe Gln Phe Ala Asn Asn Lys Pro Glu	900
Ile Glu Ala Ala Leu Phe Leu Asp Trp Met Arg Leu Glu Pro Gln	915
Ser Met Val Trp Leu Pro Val Leu His Arg Val Ala Ala Ala Glu	930
	945
Thr Ala Lys His Gln Ala Lys Cys Asn Ile Cys Lys Glu Cys Pro	960
Ile Ile Gly Phe Arg Tyr Arg Ser Leu Lys His Phe Asn Tyr Asp	975
Ile Cys Gln Ser Cys Phe Phe Ser Gly Arg Val Ala Lys Gly His	990
Lys Met His Tyr Pro Met Val Glu Tyr Cys Thr Pro Thr Thr Ser	1005
Gly Glu Asp Val Arg Asp Phe Ala Lys Val Leu Lys Asn Lys Phe	1020
Arg Thr Lys Arg Tyr Phe Ala Lys His Pro Arg Met Gly Tyr Leu	1035
Pro Val Gln Thr Val Leu Glu Gly Asp Asn Met Glu Thr Pro Val	1050
Thr Leu Ile Asn Phe Trp Pro Val Asp Ser Ala Pro Ala Ser Ser	1065
Pro Gln Leu Ser His Asp Asp Thr His Ser Arg Ile Glu His Tyr	1080
Ala Ser Arg Leu Ala Glu Met Glu Asn Ser Asn Gly Ser Tyr Leu	1095
Asn Asp Ser Ile Ser Pro Asn Glu Ser Ile Asp Asp Glu His Leu	1110
Leu Ile Gln His Tyr Cys Gln Ser Leu Asn Gln Asp Ser Pro Leu	1125
Ser Gln Pro Arg Ser Pro Ala Gln Ile Leu Ile Ser Leu Glu Ser	1140
Glu Glu Arg Gly Glu Leu Glu Arg Ile Leu Ala Asp Leu Glu Glu	1155
Glu Asn Arg Asn Leu Gln Ala Glu Tyr Asp Arg Leu Lys Gln Gln	1170
His Glu His Lys Gly Leu Ser Pro Leu Pro Ser Pro Pro Glu Met	1185
Met Pro Thr Ser Pro Gln Ser Pro Arg Asp Ala Glu Leu Ile Ala	1200
Glu Ala Lys Leu Leu Arg Gln His Lys Gly Arg Leu Glu Ala Arg	1215
Met Gln Ile Leu Glu Asp His Asn Lys Gln Leu Glu Ser Gln Leu	1230
His Arg Leu Arg Gln Leu Leu Glu Gln Pro Gln Ala Glu Ala Lys	1245
Val Asn Gly Thr Thr Val Ser Ser Pro Ser Thr Ser Leu Gln Arg	1260
Ser Asp Ser Ser Gln Pro Met Leu Leu Arg Val Val Gly Ser Gln	1275
Thr Ser Asp Ser Met Gly Glu Glu Asp Leu Leu Ser Pro Pro Gln	1290
Asp Thr Ser Thr Gly Leu Glu Glu Val Met Glu Gln Leu Asn Asn	1305
Ser Phe Pro Ser Ser Arg Gly Arg Asn Thr Pro Gly Lys Pro Met	1310
Arg Glu Asp Thr Met ***	

配列番号：7

配列の長さ：4075

配列の型：核酸

鎖の数：両形態 (both)

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列の特徴：active-site

配列

CGGCCGCTCT AGAGGATCCC CGGGTACCGA GCTCGAATTG CGGAACCTCCC GGAGAAAAAC	60
GAATAGGAAA AACTGAAGTG TTACTTTTT TAAAGCTGCT GAAGTTGTT GGTTTCTCAT	120
TGTTTTAAG CCTACTGGAG CAATAAAGTT TGAAGAACCTT TTACCAAGTT TTTTTATCG	180
CTGCCCTGAT ATACACTTTT CAAATGCTT TGTTGGGAAG AAGTAGAGGA CTGTTATGAA	240
AGAGAAGATG TTCAAAAGAA AACATTCACA AAATGGGTAA ATGCACAATT TTCTAAGTT	300
GGGAAGCAGC ATATTGAGAA CCTCTTCAGT GACCTACAGG ATGGGAGGCG CCTCCTAGAC	360
CTCCTCGAAG GCCTGACAGG GCACAAACTG CCAAAAGAAA AAGGATCCAC AAGAGTTCAT	420

47

GCCCTGAACA ATGTCACAA GGCACCGCGG GTTTGCAGA ACAATAATGT TGATTTAGTG	480
AATATTGGAA GTACTGACAT CGTAGATGGA AATCATAAAC TGACTCTGG TTGGATTGG	540
AATATAATCC TCCACTGGCA GGTCAAAAAT GTAATGAAAA ATATCATGGC TGGATTGCAA	600
CAAACCAACA GTGAAAAGAT TCTCCTGAGC TGGGTCGAC AATCAACTCG TAATTATCCA	660
CAGGTTAATG TAATCAACTT CACCAACCAGC TGGTCTGATG GCCTGGCTTT GAATGCTCTC	720
ATCCCATAGTC ATAGGCCAGA CCTATTTGAC TGGAAATAGTG TGTTTGCCA GCAGTCAGCC	780
ACACAAACGAC TGGAAACATGC ATTCACATC GCCAGATATC AATTAGGCAT AGAGAAACTA	840
CTCGATCCTG AAGATGTTGA TACCACTT CCAGATAAGA AGTCCATCTT AATGTACATC	900
ACATCACTCT TCCAAGTTT GCCTCAACAA GTGAGCATTG AAGCCATCCA GGAAGTGGAA	960
ATGTTGCCAA GGCCACCTAA AGTGACTAAA GAAGAACATT TTCAGTTACA TCATCAAATG	1020
CACTATTCTC AACAGATCAC GGTCACTA GCACAGGGAT ATGAGAGAAC TTCTTCCCCT	1080
AAGCCTOGAT TCAAGAGCTA TGCTACACA CAGGCTGCTT ATGTCACCCAC CTCTGACCCCT	1140
ACACGGAGCC CATTTCCTTC ACAGCATTG GAAGCTCTG AAGACAAGTC ATTTGGCAGT	1200
TCATTGATGG AGAGTGAAGT AAACCTGGAC CGTTATCAA CAGCTTTAGA AGAAGTATTA	1260
TGTTGGCTTC TTTCGCTGA GGACACATTG CAAGCACAAG GAGAGATTTC TAATGATGTG	1320
GAAGTGGTGA AAGACCAAGT TCATACTCAT GAGGGTACA TGATGGATTG GACAGCCAT	1380
CAGGGCCGGG TTGTAATAT TCTACAATTG GGAAGTAAGC TGATGGAAC AGGAAAATTA	1440
TCAGAAGATG AAGAAACTGA AGTACAAGAG CAGATGAATC TCCTAAATTG AAGATGGAA	1500
TGCTCAGGG TAGCTAGCAT GGAAAACAA AGCAATTAC ATAGAGTTT AATGGATCTC	1560
CAGAATCAGA AACTGAAAGA GTTGAATGAC TGGCTAACAA AAACAGAAGA AAGAACAAAGG	1620
AAAATGGAGG AAGAGCCTCT TGGACCTGAT CTTGAAGACC TAAAACGCCA AGTACAACAA	1680
CATAAGGTGC TTCAAGAAGA TCTAGAACAA GAACAAGTCA GGGTCAATTTC TCTCACTCAC	1740
ATGGTGGTGG TAGTTGATGA ATCTAGTGGA GATCACGCAA CTGCTGCTTT GGAAGAACAA	1800
CTTAAGGTAT TGAACACCAG ATGGAAGCTT CTGAGGTGG CCGTCGAGGA CCGAGTCAGG	1860
CAGCTGCATG AAGCCACAG GGACTTTGGT CCACCATCTC AGCACTTCT TTCCACGTCT	1920
GTCCAGGGTC CCTGGGAGAG AGCCATCTG CCAAACAAAG TGCCCTACTA TATCAACCAC	1980
GAGACTCAA CAACTGCTG GGACCATCCC AAAATGACAG AGCTCTACCA GTCTTCTAGCT	2040
GACCTGAATA ATGTCAGATT CTCAGTTAT AGGACTGCA TGAAACTCCG AAGACTGCAG	2100
AAGGCCCTT GCTTGGATCT CTTGAGCCTG TCACCTGCAT GTGATGCCCT GGACCCAGCAC	2160
AACCTCAAGC AAAATGACCA GCCCATGGAT ATCTGCAAGA TTATTAATTG TTGGACCACT	2220
ATTTATGACC GCCTGGAGCA AGAGCACAAC AATTGGTCA ACCTCCCTCT CTGGCTGGAT	2280
ATGTGCTGA ACTGGCTGCT GAATGTTTAT GATAACGGGAC GAACAGGGAG GATCCGTGTC	2340
CTGTCCTTTA AAACTGGCAT CATTCCCTG TGAAAGCAC ATTTGGAAGA CAAGTACAGA	2400
TACCTTTCA AGCAAGTGGC AAGTCAACA GGATTTGTG ACCAGCGAG GCTGGCCCTC	2460
CTTCTGCATG ATTCTATCCA AATTCCAAGA CAGTTGGGTG AAGTTGCATC CTTGGGGGC	2520
AGTAACATTG AGCCAAGTGT CCGGAGCTGC TTCCAATTG CTAATAATAA GCCAGAGATC	2580
GAAGGGGCC TCTTCTAGA CTGGATGAGA CTGGAACCCC AGTCCATGGT GTGGCTGCC	2640
GTCCTGCACA GAGTGGCTGC TGCAAGAACT GCCAAGCATC AGGCCAAATG TAACATCTGC	2700
AAAGAGTGTGTC CAATCATGG ATTCAAGGTAC AGGAGTCTAA AGCACTTAA TTATGACATC	2760
TGCCAAAGCT GCTTTTTTC TGTTGAGATT GCAAAAGGCC ATAAAATGCA CTATCCCATG	2820
GTGGAATATT GCACCTCGAC TACATCGAGA GAAGATGTTG GAGACTTTGC CAAGGTACTA	2880
AAAAACAAAT TTGCAACAA AAGGTATTG GCGAAGCATC CCGGAATGGG CTACCTGCCA	2940
GTGCAGACTG TCTTAGAGGG GGACAAACATG GAAACTCCCG TTACTCTGAT CAACTCTGG	3000
CCAGTAGATT CTGCGCTGC CTGCTCCCT CAGTTTCAC AGCATGATAC TCATTACACGC	3060
ATTGAACATT ATGCTAGCAG GCTAGCAGAA ATGAAAACCA GCAATGGATC TTATCTAAAT	3120
GATAGCATCT CTCTTAATGA GAGCATAGAT GATGAACATT TGTTAATCCA GCATTAATG	3180
CAAAGTTGA ACCAGGACTC CCCCCCTGAGC CAGCCTCGTA TGCTGCCA GATCTTGATT	3240
TCCTTAGAGA GTGAGGAAAG AGGGAGCTA GAGAGAATCC TAGCAGATCT TGAGGAAGAA	3300
AACAGGAATC TGCAAGCAGA ATATGACCGT CTAAGCAGC AGCACGAACA TAAAGGCC	3360

TCCCCACTGC CGTCCCCCTCC TGAAATGATG CCCACCTCTC CCCAGAGTCC CGGGATGCT 3420  
 GAGCTCATTG CTGAGGCCAA GCTACTGCGT CAACACAAAG GCGCCTGGA AGCCAGGATG 3480  
 CAAATCTGG AAGACCCAA TAAACAGCTG GAGTCACAGT TACACAGGCT AAGGCAGCTG 3540  
 CTGGAGCAAC CCCAGGCAGA GGCAAAGTG AATGGCACAA CGGTGTCCTC TCCTTCTACC 3600  
 TCTCTACAGA GGTCCGACAG CAGTCAGCCT ATGCTGCTCC GAGTGGTTGG CAGTCAAACT 3660  
 TOGGACTCCA TGGGTGAGGA AGATCTTCTC AGTCCTCCCC AGGACACAAG CACAGGGTTA 3720  
 GAGGGAGTGA TGGAGCAACT CAACAACCTC TTCCCTAGTT CAAGAGGAAG AAATACCCCT 3780  
 GGAAAGCCAA TGAGAGAGGA CACAATGTAG GAAGTCTTTT CCACATGGCA GATGATTTGG 3840  
 GCAGAGGAGAT GGAGTCTTA GTATCAGTCA TGACAGATGA AGAAGGAGCA GAATAATATGT 3900  
 TTTACAACTC CTGATTCCCG CATGGTTTT ATAATATTCA TACAACAAAG AGGATTAGAC 3960  
 AGTAAGAGTT TACAAGAAAT AAATCTATAT TTTGTGAAG GGTAGTGGTA TTAACTGTA 4020  
 GATTCAGTA GTTTCTAAGT CTGTTATTGT TTTGTGGGG ATCTCTAGA GTCGA 4075

配列番号: 8

配列の長さ: 1201

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: タンパク質

配列

Met	Leu	Trp	Trp	Glu	Glu	Val	Glu	Asp	Cys	Tyr	Glu	Arg	Glu	Asp	15
Val	Gln	Lys	Lys	Thr	Phe	Thr	Lys	Trp	Val	Asn	Ala	Gln	Phe	Ser	30
Lys	Phe	Gly	Lys	Gln	His	Ile	Glu	Asn	Leu	Phe	Ser	Asp	Leu	Gln	45
Asp	Gly	Arg	Arg	Leu	Leu	Asp	Leu	Leu	Glu	Gly	Leu	Thr	Gly	Gln	60
Lys	Leu	Pro	Lys	Glu	Lys	Gly	Ser	Thr	Arg	Val	His	Ala	Leu	Asn	75
Asn	Val	Asn	Lys	Ala	Leu	Arg	Val	Leu	Gln	Asn	Asn	Asn	Val	Asp	90
Leu	Val	Asn	Ile	Gly	Ser	Thr	Asp	Ile	Val	Asp	Gly	Asn	His	Lys	105
Leu	Thr	Leu	Gly	Leu	Ile	Trp	Asn	Ile	Ile	Leu	His	Trp	Gln	Val	120
Lys	Asn	Val	Met	Lys	Asn	Ile	Met	Ala	Gly	Leu	Gln	Gln	Thr	Asn	135
Ser	Glu	Lys	Ile	Leu	Leu	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ser	Thr	Arg	Asn	150
Tyr	Pro	Gln	Val	Asn	Val	Ile	Asn	Phe	Thr	Thr	Ser	Trp	Ser	Asp	165
Gly	Leu	Ala	Leu	Asn	Ala	Ile	His	Ser	His	Arg	Pro	Asp	Leu		180
Phe	Asp	Trp	Asn	Ser	Val	Val	Cys	Gln	Gln	Ser	Ala	Thr	Gln	Arg	195

Leu	Glu	His	Ala	Phe	Asn	Ile	Ala	Arg	Tyr	Gln	Leu	Gly	Ile	Glu	210
Lys	Leu	Leu	Asp	Pro	Glu	Asp	Val	Asp	Thr	Thr	Tyr	Pro	Asp	Lys	225
Lys	Ser	Ile	Leu	Met	Tyr	Ile	Thr	Ser	Leu	Phe	Gln	Val	Leu	Pro	240
Gln	Gln	Val	Ser	Ile	Glu	Ala	Ile	Gln	Glu	Val	Glu	Met	Leu	Pro	255
Arg	Pro	Pro	Lys	Val	Thr	Lys	Glu	Glu	His	Phe	Gln	Leu	His	His	270
Gln	Met	His	Tyr	Ser	Gln	Gln	Ile	Thr	Val	Ser	Leu	Ala	Gln	Gly	285
Tyr	Glu	Arg	Thr	Ser	Ser	Pro	Lys	Pro	Arg	Phe	Lys	Ser	Tyr	Ala	300
Tyr	Thr	Gln	Ala	Ala	Tyr	Val	Thr	Thr	Ser	Asp	Pro	Thr	Arg	Ser	315
Pro	Phe	Pro	Ser	Gln	His	Leu	Glu	Ala	Pro	Glu	Asp	Lys	Ser	Phe	330
Gly	Ser	Ser	Leu	Met	Glu	Ser	Glu	Val	Asn	Leu	Asp	Arg	Tyr	Gln	345
Thr	Ala	Leu	Glu	Glu	Val	Leu	Ser	Trp	Leu	Leu	Ser	Ala	Glu	Asp	360
Thr	Leu	Gln	Ala	Gln	Gly	Glu	Ile	Ser	Asn	Asp	Val	Glu	Val	Val	375
Lys	Asp	Gln	Phe	His	Thr	His	Glu	Gly	Tyr	Met	Met	Asp	Leu	Thr	390
Ala	His	Gln	Gly	Arg	Val	Gly	Asn	Ile	Leu	Gln	Leu	Gly	Ser	Lys	405
Leu	Ile	Gly	Thr	Gly	Lys	Leu	Ser	Glu	Asp	Glu	Glu	Thr	Glu	Val	420
Gln	Glu	Gln	Met	Asn	Leu	Leu	Asn	Ser	Arg	Trp	Glu	Cys	Leu	Arg	435
Val	Ala	Ser	Met	Glu	Lys	Gln	Ser	Asn	Leu	His	Arg	Val	Leu	Met	450

51

Asp Leu Gln Asn Gln Lys Leu Lys Glu Leu Asn Asp Trp Leu Thr	465
Lys Thr Glu Glu Arg Thr Arg Lys Met Glu Glu Glu Pro Leu Gly	480
Pro Asp Leu Glu Asp Leu Lys Arg Gln Val Gln Gln His Lys Val	495
Leu Gln Glu Asp Leu Glu Gln Glu Glu Val Arg Val Asn Ser Leu	510
Thr His Met Val Val Val Val Asp Glu Ser Ser Gly Asp His Ala	525
Thr Ala Ala Leu Glu Glu Gln Leu Lys Val Leu Asn Thr Arg Trp	540
Lys Leu Leu Gln Val Ala Val Glu Asp Arg Val Arg Gln Leu His	555
Glu Ala His Arg Asp Phe Gly Pro Ala Ser Gln His Phe Leu Ser	570
Thr Ser Val Gln Gly Pro Trp Glu Arg Ala Ile Ser Pro Asn Lys	585
Val Pro Tyr Tyr Ile Asn His Glu Thr Gln Thr Thr Cys Trp Asp	600
His Pro Lys Met Thr Glu Leu Tyr Gln Ser Leu Ala Asp Leu Asn	615
Asn Val Arg Phe Ser Ala Tyr Arg Thr Ala Met Lys Leu Arg Arg	630
 Leu Gln Lys Ala Leu Cys Leu Asp Leu Leu Ser Leu Ser Ala Ala	645
Cys Asp Ala Leu Asp Gln His Asn Leu Lys Gln Asn Asp Gln Pro	660
Met Asp Ile Leu Gln Ile Ile Asn Cys Leu Thr Thr Ile Tyr Asp	675
Arg Leu Glu Gln Glu His Asn Asn Leu Val Asn Val Pro Leu Cys	690
Val Asp Met Cys Leu Asn Trp Leu Leu Asn Val Tyr Asp Thr Gly	705
Arg Thr Gly Arg Ile Arg Val Leu Ser Phe Lys Thr Gly Ile Ile	720
Ser Leu Cys Lys Ala His Leu Glu Asp Lys Tyr Arg Tyr Leu Phe	735
Lys Gln Val Ala Ser Ser Thr Gly Phe Cys Asp Gln Arg Arg Leu	750
Gly Leu Leu Leu His Asp Ser Ile Gln Ile Pro Arg Gln Leu Gly	765
Glu Val Ala Ser Phe Gly Gly Ser Asn Ile Glu Pro Ser Val Arg	780
Ser Cys Phe Gln Phe Ala Asn Asn Lys Pro Glu Ile Glu Ala Ala	795
Leu Phe Leu Asp Trp Met Arg Leu Glu Pro Gln Ser Met Val Trp	810
Leu Pro Val Leu His Arg Val Ala Ala Glu Thr Ala Lys His	825
Gln Ala Lys Cys Asn Ile Cys Lys Glu Cys Pro Ile Ile Gly Phe	840
Arg Tyr Arg Ser Leu Lys His Phe Asn Tyr Asp Ile Cys Gln Ser	855
Cys Phe Phe Ser Gly Arg Val Ala Lys Gly His Lys Met His Tyr	870
Pro Met Val Glu Tyr Cys Thr Pro Thr Thr Ser Gly Glu Asp Val	885
Arg Asp Phe Ala Lys Val Leu Lys Asn Lys Phe Arg Thr Lys Arg	900
Tyr Phe Ala Lys His Pro Arg Met Gly Tyr Leu Pro Val Gln Thr	915
Val Leu Glu Gly Asp Asn Met Glu Thr Pro Val Thr Leu Ile Asn	930
Phe Trp Pro Val Asp Ser Ala Pro Ala Ser Ser Pro Gln Leu Ser	945
His Asp Asp Thr His Ser Arg Ile Glu His Tyr Ala Ser Arg Leu	960
Ala Glu Met Glu Asn Ser Asn Gly Ser Tyr Leu Asn Asp Ser Ile	975
Ser Pro Asn Glu Ser Ile Asp Asp Glu His Leu Leu Ile Gln His	990
Tyr Cys Gln Ser Leu Asn Gln Asp Ser Pro Leu Ser Gln Pro Arg	1005
Ser Pro Ala Gln Ile Leu Ile Ser Leu Glu Ser Glu Glu Arg Gly	1020
Glu Leu Glu Arg Ile Leu Ala Asp Leu Glu Glu Glu Asn Arg Asn	1035
Leu Gln Ala Glu Tyr Asp Arg Leu Lys Gln Gln His Glu His Lys	1050
Gly Leu Ser Pro Leu Pro Ser Pro Pro Glu Met Met Pro Thr Ser	1065
 Pro Gln Ser Pro Arg Asp Ala Glu Leu Ile Ala Glu Ala Lys Leu	1080
Leu Arg Gln His Lys Gly Arg Leu Glu Ala Arg Met Gln Ile Leu	1095
Glu Asp His Asn Lys Gln Leu Glu Ser Gln Leu His Arg Leu Arg	1110
Gln Leu Leu Glu Gln Pro Gln Ala Glu Ala Lys Val Asn Gly Thr	1125
Thr Val Ser Ser Pro Ser Thr Ser Leu Gln Arg Ser Asp Ser Ser	1140
Gln Pro Met Leu Leu Arg Val Val Gly Ser Gln Thr Ser Asp Ser	1155
Met Gly Glu Glu Asp Leu Leu Ser Pro Pro Gln Asp Thr Ser Thr	1170

53

Gly Leu Glu Glu Val Met Glu Gln Leu Asn Asn Ser Phe Pro Ser 1185  
 Ser Arg Gly Arg Asn Thr Pro Gly Lys Pro Met Arg Glu Asp Thr 1200  
 Met \*\*\* 1201

配列番号: 9

配列の長さ: 3172

配列の型: 核酸

鎖の数: 両形態 (both)

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

配列の特徴: active-site

配列

CGGCGCTCT	AGAGGATCCC	CGGGTACCGA	GCTCGAATT	CGGAACCTCCC	GGAGAAAAAC	60
GAATAGAAA	AACTGAAGTG	TTACTTTTTT	TAAAGCTGCT	GAAGTTGTT	GGTTTCTCAT	120
TGTTTTAAG	CCTACTGGAG	CAATAAAAGT	TGAAGAACTT	TTACCAAGTT	TTTTTTATCG	180
CTGCCTTGAT	ATACACTTTT	CAAAATGCTT	TGGTGGGAAG	AAAGTAGAGGA	CTGTTATGAA	240
AGAGAAGATG	TTCAAAAGAA	AACATTACA	AAATGGGTA	ATGCCAATT	TTCTAAGTT	300
GGGAAGCAGC	ATATTGAGAA	CCTCTTCAGT	GACCTACAGG	ATGGGAGGCG	CCTCCTAGAC	360
CTCCCTGAAG	GCCTGACAGG	GCAAAAGACTG	CCAAAAGAAA	AAAGGATCCAC	AAGAGTTCAT	420
GCCCTGAACA	ATGCAACAA	GGCACTGOGG	GTTTGCAGA	ACAATAATGT	TGATTTAGTG	480
AAATATGAA	GTACTGACAT	CGTAGATGGA	AATCATAAAC	TGACTCTTGG	TTTGATTTGG	540
AAATAATCC	TCCACTGGCA	GGTCAAAAT	GTAATGAAA	ATATCATGGC	TGGATTGCAA	600
CAAACCAACA	GTGAAAAGAT	TCTCTGAGC	TGGGTCCGAC	AATCAACTCG	TAATTATCCA	660
CAGGTTAATG	TAATCAACTT	CACCAACCAGC	TGGTCTGATG	GCCTGGCTTT	GAATGCTCTC	720
ATCCATAGTC	ATAGGCCAGA	CCTATTGAC	TGGAATAGTG	TGGTTGCCA	GCAGTCAGCC	780
ACACAAACGAC	TGGAACATGC	ATTCAACATC	GCCAGATATC	AATTAGGCAT	AGAGAAACTA	840
CTCGATCCTG	AAAGATGTTGA	TACCACTTAT	CCAGATAAGA	AGTCCATCTT	AATGTACATC	900
ACATCACTCT	TCCAAGTTT	GCCTCAACAA	GTGAGCATTG	AAGCCATCCA	GGAAAGTGGAA	960
ATGTTGCCAA	GGCCACCTAA	AGTGAATAAA	GAAGAACATT	TTCAAGTTACA	TCATCAAATG	1020
CACTATTCTC	AACAGATCAC	GGTCAGTCTA	GCACAGGGAT	ATGAGAGAAC	TTCTTCCCCT	1080
AAGCCTCGAT	TCAAGAGCTA	TGCCCTACACA	CAGGCTGCTT	ATGTCACAC	CTCTGACCCCT	1140
ACACGGAGCC	CATTTCCTTC	ACAGCATTG	GAAGCTCCTG	AAGACCGAAG	ACTGCAGAAG	1200
GCCTTGTCT	TGGATCTCTT	GACCTGTCA	GCTGCATGTG	ATGCCCTTGG	CCAGCACAAC	1260
CTCAAGCAA	ATGACCAGCC	CATGGATATC	CTGCAGATT	TAAATTGTTT	GACCACTATT	1320
TATGACGCC	TGGAGCAAGA	GCACAACAT	TTGGTCAACG	TCCCTCTG	CGTGGATATG	1380
TGTCTGAAC	GGCTGCTGAA	TGTTTATGAT	ACGGGACGAA	CAGGGAGGAT	CGTGCTCTG	1440
TCTTTAAAA	CTGGCATCAT	TTCCCTGTGT	AAAGCACATT	TGGAAGACAA	GTACAGATAC	1500
CTTTTCAAGC	AAAGTGGCAAG	TTCAACAGGA	TTTTGTGACC	AGGGCAGGCT	GGGCCTCCTT	1560
CTGCATGATT	CTATCCAAAT	TCCAAGACAG	TTGGGTGAAG	TTGCATCCTT	TGGGGGCAGT	1620
AAACATTGAGC	CAAGTGTCCG	GAGCTGCTTC	CAATTGCTA	ATAATAAGCC	AGAGATCGAA	1680
GCGGCCCTCT	TCCTAGACTG	GATGAGACTG	GAACCCCGAT	CCATGGTGTG	GCTGCCGTC	1740
CTGCACAGAG	TGGCTGTCG	AGAAACTGCC	AAGCATCAGG	CCAAATGTAA	CATCTGCAA	1800
GACTGTCAA	TCATTGGATT	CAGGTACAGG	ACTCTAAAGC	ACTTTAATTA	TGACATCTGC	1860
CAAAGCTGCT	TTTTTCTGG	TCGAGTTGCA	AAAGGCCATA	AAATGCACTA	TCCCATGGTG	1920
GAATATTGCA	CTCCGACTAC	ATCAGGAGAA	GATGTTGAG	ACTTTGCCAA	GGTACTAAAA	1980
AAACAAATTTC	GAACCAAAAG	GTATTTGCG	AAGCATCCCC	GAATGGGCTA	CCTGCCAGTG	2040
CAGACTGTCT	TAGAGGGGAA	CAACATGGAA	ACTCCCGTTA	CTCTGATCAA	CTTCTGGCCA	2100
GTAGATTCTG	CGCCCTGCCTC	GTCCCTCGAG	CTTTCACACG	ATGATACTCA	TTCACGCATT	2160
GAACATTATG	CTAGCAGGCT	AGCAGAAATG	GAAACAGCA	ATGGATCTTA	TCTAAATGAT	2220
AGCATCTCTC	CTAATGAGAG	CATAGATGAT	GAACATTGTT	TAATCCAGCA	TTACTGCCAA	2280

55

AGTTTGAACC	AGGACTCCCC	CCTGAGCCAG	CCTCGTAGTC	CTGCCAGAT	CTTGATTTC	2340
TTAGAGAGTG	AGGAAAGAGG	GGAGCTAGAG	AGAACCTAG	CAGATCTGA	GGAAGAAAAC	2400
AGGAATCTGC	AAGCAGAATA	TGACCGTCA	AAGCAGCAGC	ACGAACATAA	AGGCCTGTCC	2460
CCACTGCCGT	CCCCCTCTGA	AATGATGCC	ACCTCTCCC	AGAGTCCC	GGATGCTGAG	2520
CTCATTGCTG	AGGCCAAGCT	ACTGCGTCAA	CACAAAGGCC	GCCTGGAAGC	CAGGATGCAA	2580
ATCCTGGAAG	ACCACAATAA	ACAGCTGGAG	TCACAGTTAC	ACAGGCTAAG	GCAGCTGCTG	2640
GAGCAACCCC	AGGCAGAGGC	CAAAGTGAAT	GGCACAAACGG	TGTCCCTCTCC	TTCTACCTCT	2700
CTACAGAGGT	CCGACAGCG	TCAGCCTATG	CTGCTCOGAG	TGGTTGGAG	TCAAACCTCG	2760
GACTCCATGG	GTGAGGAAGA	TCTTCTCAGT	CCTCCCCAGG	ACACAAGCAC	AGGGTTAGAG	2820
GAGGTGATGG	AGCAACTCAA	CAACTCCTTC	CCTAGTTCAA	GAGGAAGAAA	TACCCCTGGA	2980
AAGCCAATGA	GAGAGGACAC	AATGAGGAA	GTCTTTCCA	CATGGCAGAT	GATTGGGCA	2940
GAGCGATGGA	GTCTTAGTA	TCAGTCATGA	CAGATGAAGA	AGGAGCAGAA	TAATGTTTT	3000
ACAACCTCTG	ATTCCCGAT	GGTTTTATA	ATATTCTAC	AACAAAGAGG	ATTAGACAGT	3060
AAGAGTTAC	AAGAATAAA	TCTATATTT	TGTGAAGGGT	AGTGGTATTA	TACTGTAGAT	3120
TTCAGTAGTT	TCTAAGTCTG	TTATTGTTT	GTTGGGATC	CTCTAGAGTC	GA	3172

配列番号: 10

配列の長さ: 900

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: タンパク質

配列

Met	Leu	Trp	Trp	Glu	Glu	Val	Glu	Asp	Cys	Tyr	Glu	Arg	Glu	Asp	15
Val	Gln	Lys	Lys	Thr	Phe	Thr	Lys	Trp	Val	Asn	Ala	Gln	Phe	Ser	30
Lys	Phe	Gly	Lys	Gln	His	Ile	Glu	Asn	Leu	Phe	Ser	Asp	Leu	Gln	45
Asp	Gly	Arg	Arg	Leu	Leu	Asp	Leu	Leu	Glu	Gly	Leu	Thr	Gly	Gln	60
Lys	Leu	Pro	Lys	Glu	Lys	Gly	Ser	Thr	Arg	Val	His	Ala	Leu	Asn	75
Asn	Val	Asn	Lys	Ala	Leu	Arg	Val	Leu	Gln	Asn	Asn	Asn	Val	Asp	90
Leu	Val	Asn	Ile	Gly	Ser	Thr	Asp	Ile	Val	Asp	Gly	Asn	His	Lys	105
Leu	Thr	Leu	Gly	Leu	Ile	Trp	Asn	Ile	Ile	Leu	His	Trp	Gln	Val	120
Lys	Asn	Val	Met	Lys	Asn	Ile	Met	Ala	Gly	Leu	Gln	Gln	Thr	Asn	135
Ser	Glu	Lys	Ile	Leu	Leu	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ser	Thr	Arg	Asn	150
Tyr	Pro	Gln	Val	Asn	Val	Ile	Asn	Phe	Thr	Thr	Ser	Trp	Ser	Asp	165
Gly	Leu	Ala	Leu	Asn	Ala	Leu	Ile	His	Ser	His	Arg	Pro	Asp	Leu	180
Phe	Asp	Trp	Asn	Ser	Val	Val	Cys	Gln	Gln	Ser	Ala	Thr	Gln	Arg	195
Leu	Glu	His	Ala	Phe	Asn	Ile	Ala	Arg	Tyr	Gln	Leu	Gly	Ile	Glu	210
Lys	Leu	Leu	Asp	Pro	Glu	Asp	Val	Asp	Thr	Thr	Tyr	Pro	Asp	Lys	225
Lys	Ser	Ile	Leu	Met	Tyr	Ile	Thr	Ser	Leu	Phe	Gln	Val	Leu	Pro	240
Gln	Gln	Val	Ser	Ile	Glu	Ala	Ile	Gln	Glu	Val	Glu	Met	Leu	Pro	255
Arg	Pro	Pro	Lys	Val	Thr	Lys	Glu	Glu	His	Phe	Gln	Leu	His	His	270
Gln	Met	His	Tyr	Ser	Gln	Gln	Ile	Thr	Val	Ser	Leu	Ala	Gln	Gly	285
Tyr	Glu	Arg	Thr	Ser	Ser	Pro	Lys	Pro	Arg	Phe	Lys	Ser	Tyr	Ala	300
Tyr	Thr	Gln	Ala	Ala	Tyr	Val	Thr	Thr	Ser	Asp	Pro	Thr	Arg	Ser	315
Pro	Phe	Pro	Ser	Gln	His	Leu	Glu	Ala	Pro	Glu	Asp	Arg	Arg	Leu	330
Gln	Lys	Ala	Leu	Cys	Leu	Asp	Leu	Leu	Ser	Leu	Ser	Ala	Ala	Cys	345
Asp	Ala	Leu	Asp	Gln	His	Asn	Leu	Lys	Gln	Asn	Asp	Gln	Pro	Met	360
Asp	Ile	Leu	Gln	Ile	Ile	Asn	Cys	Leu	Thr	Thr	Ile	Tyr	Asp	Arg	375
Leu	Glu	Gln	Glu	His	Asn	Asn	Leu	Val	Asn	Val	Pro	Leu	Cys	Val	390
Asp	Met	Cys	Leu	Asn	Trp	Leu	Leu	Asn	Val	Val	Tyr	Asp	Thr	Gly	405

57

Thr Gly Arg Ile Arg Val Leu Ser Phe Lys Thr Gly Ile Ile Ser	420
Leu Cys Lys Ala Ile Leu Glu Asp Lys Tyr Arg Tyr Leu Phe Lys	435
Gln Val Ala Ser Ser Thr Gly Phe Cys Asp Gln Arg Arg Leu Gly	450
Leu Leu Leu His Asp Ser Ile Gln Ile Pro Arg Gln Leu Gly Glu	465
Val Ala Ser Phe Gly Gly Ser Asn Ile Glu Pro Ser Val Arg Ser	480
Cys Phe Gln Phe Ala Asn Asn Lys Pro Glu Ile Glu Ala Ala Leu	495
Phe Leu Asp Trp Met Arg Leu Glu Pro Gln Ser Met Val Trp Leu	510
Pro Val Leu His Arg Val Ala Ala Glu Thr Ala Lys His Gln	525
Ala Lys Cys Asn Ile Cys Lys Glu Cys Pro Ile Ile Gly Phe Arg	540
Tyr Arg Ser Leu Lys His Phe Asn Tyr Asp Ile Cys Gln Ser Cys	555
Phe Phe Ser Gly Arg Val Ala Lys Gly His Lys Met His Tyr Pro	570
Met Val Glu Tyr Cys Thr Pro Thr Ser Gly Glu Asp Val Arg	585
Asp Phe Ala Lys Val Leu Lys Asn Lys Phe Arg Thr Lys Arg Tyr	600
Phe Ala Lys His Pro Arg Met Gly Tyr Leu Pro Val Gln Thr Val	615
Leu Glu Gly Asp Asn Met Glu Thr Pro Val Thr Leu Ile Asn Phe	630
Trp Pro Val Asp Ser Ala Pro Ala Ser Ser Pro Gln Leu Ser His	645
Asp Asp Thr His Ser Arg Ile Glu His Tyr Ala Ser Arg Leu Ala	660
 Glu Met Glu Asn Ser Asn Gly Ser Tyr Leu Asn Asp Ser Ile Ser	675
Pro Asn Glu Ser Ile Asp Asp Glu His Leu Leu Ile Gln His Tyr	690
Cys Gln Ser Leu Asn Gln Asp Ser Pro Leu Ser Gln Pro Arg Ser	705
Pro Ala Gln Ile Leu Ile Ser Leu Glu Ser Glu Glu Arg Gly Glu	720
Leu Glu Arg Ile Leu Ala Asp Leu Glu Glu Glu Asn Arg Asn Leu	735
Gln Ala Glu Tyr Asp Arg Leu Lys Gln Gln His Glu His Lys Gly	750
Leu Ser Pro Leu Pro Ser Pro Pro Glu Met Met Pro Thr Ser Pro	765
Gln Ser Pro Arg Asp Ala Glu Leu Ile Ala Glu Ala Lys Leu Leu	780
Arg Gln His Lys Gly Arg Leu Glu Ala Arg Met Gln Ile Leu Glu	795
Asp His Asn Lys Gln Leu Glu Ser Gln Leu His Arg Leu Arg Gln	810
Leu Leu Glu Gln Pro Gln Ala Glu Ala Lys Val Asn Gly Thr Thr	825
Val Ser Ser Pro Ser Thr Ser Leu Gln Arg Ser Asp Ser Ser Gln	840
Pro Met Leu Leu Arg Val Val Gly Ser Gln Thr Ser Asp Ser Met	855
Gly Glu Glu Asp Leu Leu Ser Pro Pro Gln Asp Thr Ser Thr Gly	870
Leu Glu Glu Val Met Glu Gln Leu Asn Asn Ser Phe Pro Ser Ser	885
Arg Gly Arg Asn Thr Pro Gly Lys Pro Met Arg Glu Asp Thr Met	900

\*\*\*

配列番号：11

配列の長さ：3163

配列の型：核酸

鎖の数：両形態（both）

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列の特徴：active-site

配列

CGGCCGCTCT AGAGGATCCC CGGGTACCGA GCTCGAATTG CGGAACCTCCC GGAGAAAAAC	60
GAATAGAAA AACTGAAGTG TTACTTTTTT TAAAGCTGCT GAAGTTTGTT GGTTTCTCAT	120
TGTTTTAAG CCTACTGGAG CAATAAAGTT TGAAGAACTT TTACCAAGTT TTTTTATCG	180
CTGCCTTGAT ATACACTTTT CAAATGCTT TGGTGGGAAG AAGTAGAGGA CTGTTATGAA	240
AGAGAAGATG TTCAAAAGAA AACATTCAAA AAATGGGTAA ATGCACAATT TTCTAAGTT	300
GGGAAGCAGC ATATTGAGAA CCTCTTCAGT GACCTACAGG ATGGGAGGCG CCTCCTAGAC	360
CTCCTCGAAG GCCTGACAGG GCAAAAGTG CCAAAAGAAA AAGGATCCAC AAGAGTTCAT	420

GCCCTGAACA ATGTCAACAA GGCACGTGGG GTTTGCAGA ACAATAATGT TGATTTAGTG	480
AATATTGGAA GTACTGACAT CGTAGATGGA AATCATAAAC TGACTCTTGG TTTGATTGG	540
AATATAATCC TCCACTGGCA GGTCAAAAAT GTAATGAAA ATATCATGGC TGATTGCAA	600
CAAACCAACA GTGAAAAGAT TCTCTGAGC TGGGTCGAC AATCAACTCG TAATTATCCA	660
CAGGTTAATG TAATCAACTT CACCAACCAGC TGGTCTGATG GCCTGGCTT GAATGCTTC	720
ATCCATAGTC ATAGGCCAGA CCTATTTGAC TCGAATAGTG TGTTTGCCA GCAGTCAGCC	780
ACACAAACGAC TGGAACATGC ATTCAACATC GCCAGATATC AATTAGGCAT AGAGAAACTA	840
CTCGATCTG AAGATGTGA TACCACTAT CCAGATAAGA AGTCCATCTT AATGTACATC	900
ACATCACTCT TCCAAGTTT GCCTCAACAA GTGAGCATTG AAGCCATCCA GGAAGTGGAA	960
GCCCCACAGGG ACTTTGGTCC AGCATCTCG CACTTCTT CCACGCTGTG CCAGGGTCCC	1020
TGGGAGAGAG CCATCTGCC AAACAAAGTG CCCTACTATA TCAACCAOGA GACTCAAACA	1080
ACTTGCTGGG ACCATCCAA AATGACAGAG CTCTACCACT TTTAGCTGA CCTGAATAAT	1140
GTCAGATTCT CAGCTTATAG GACTGCCATG AAACCTCGAA GACTGCAGAA GGCCTTTGC	1200
TTGGATCTCT TGAGCCTGTC AGCTGCATGT GATGCCCTGG ACCAGCACAA CCTCAAGCAA	1260
AATGACCAGC CCATGGATAT CCTGCAGATT ATTAATTGTT TGACCACTAT TTATGACCGC	1320
CTGGAGCAAG AGCACAACAA TTGGTCAAC GTCCCTCTC GCGTGGATAT GTGCTGAAAC	1380
TGGCTGCTGA ATGTTTATGA TACGGGACGA ACAGGGAGGA TCCGTGCTCT GTCTTTAAA	1440
ACTGGCATCA TTCCCTGTG TAAAGCACAT TTGGAAGACA AGTACAGATA CCTTTTCAAG	1500
CAAGTGGCAA GTTCAACAGG ATTTGTGAC CAGGCCAGG TGGGCCCTCT TCTGCATGAT	1560
TCTATCCAAA TTCCAAGACA GTTGGGTGAA GTTGCATCTT TTGGGGCAG TAACATTGAG	1620
CCAAGTGTCC GGAGCTGCTT CCAATTGCT AATAATAAGC CAGAGATCGA AGCGGCCCTC	1680
TTCTAGACT GGATGAGACT GGAACCCAG TCCATGGTGT GGCTGCCGT CCTGCACAGA	1740
GTGGCTGCTG CAGAAACTGC CAAGCATCG GCCAAATGTA ACATCTGCAA AGAGTGTCCA	1800
ATCATTGGAT TCAGGTACAG GAGTCTAAAG CACTTAATT ATGACATCTG CCAAAGCTGC	1860
TTTTTTCTG GTCGAGTTGC AAAAGCCAT AAAATGCACT ATCCCATGGT GGAATATTGC	1920
ACTCOGACTA CATCAGGAGA AGATGTGCA GACTTGCCA AGGACTAAA AAACAAATT	1980
CGAACCAAAA GGTATTTGCA GAAGCATCCC CGAATGGGCT ACCTGCCAGT GCAGACTGTC	2040
TTAGAGGGGG ACAACATGGA AACTCCCGTT ACTCTGATCA ACTCTGGCC AGTAGATTCT	2100
GCGCTGCCT CGTCCCTCA GCTTTCACAC GATGATACTC ATTCAACCAT TGAACATTAT	2160
 GCTAGCAGGC TAGCAGAAAT GGAAAACAGC AATGGATCTT ATCTAAATGA TAGCATCTCT	2220
CCTAATGAGA GCATAGATGA TGAACATTG TTAATCCAGC ATTACTGCCA AAGTTTGAAAC	2280
CAGGACTCCC CCCTGAGCCA GCCTCGTAGT CCTGCCAGA TCTTGATTT CTAGAGAGT	2340
GAGGAAAGAG GGGAGCTAGA GAGAATCTA GCAGATCTG AGGAAGAAAA CAGGAATCTG	2400
CAAGCAGAAAT ATGACCGTCT AAAGCAGCAG CACCAACATA AAGGCCCTGTC CCCACTGCCG	2460
TCCCTCTG AAATGATGCC CACCTCTCCC CAGAGTCCCC GGGATGCTGA GCTCATGGCT	2520
GAGGCCAAGC TACTGCGTCA ACACAAAGGC CGCCCTGGAAG CCAGGATGCA AATCCCTGGAA	2580
GACCACAATA AACAGCTGGA GTCACAGTTA CACAGGCTAA GGAGCTGCT GGAGCAACCC	2640
CAGGCAGAGG CCAAAGTGA TGGCACAACG GTGTCTCTC CTCTACCTC TCTACAGAGG	2700
TCCGACAGCA GTCACTGCTAT GCTGCTCCGA GTGGTTGGCA GTCAAACCTTC GGACTCCATG	2760
GGTGAGGAAG ATCTTCTCG TCCCTCCCG GACACAAGCA CAGGGTTAGA GGAGGTGATG	2820
GAGCAACTCA ACAACTCCTT CCCCAGTTA AGAGGAAGAA ATACCCCTGG AAAGCCAATG	2880
AGAGAGGACA CAATGTAGGA AGTCTTTCC ACATGGCAGA TGATTTGGC AGAGCGATGG	2940
AGTCCTTAGT ATCACTCATG ACAGATGAAG AAGGAGCAGA ATAATGTTT TACAACCTCT	3000
GATTCCCGCA TGGTTTTAT AATATTCTA CAACAAAGAG GATTAGACAG TAAGAGTTA	3060
CAAGAAATAA ATCTATATT TTGTGAAGGG TAGTGGTATT ATACTGTAGA TTTCAGTAGT	3120
TTCTAAGTCT GTTATGTTT TGTGGGGAT CCTCTAGAGT CGA	3163

配列番号：12

配列の長さ：897

61

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: タンパク質

配列

Met Leu Trp Trp Glu Glu Val Glu Asp Cys Tyr Glu Arg Glu Asp	15
Val Gln Lys Lys Thr Phe Thr Lys Trp Val Asn Ala Gln Phe Ser	30
Lys Phe Gly Lys Gln His Ile Glu Asn Leu Phe Ser Asp Leu Gln	45
Asp Gly Arg Arg Leu Leu Asp Leu Leu Glu Gly Leu Thr Gly Gln	60
Lys Leu Pro Lys Glu Lys Gly Ser Thr Arg Val His Ala Leu Asn	75
Asn Val Asn Lys Ala Leu Arg Val Leu Gln Asn Asn Asn Val Asp	90
Leu Val Asn Ile Gly Ser Thr Asp Ile Val Asp Gly Asn His Lys	105
Leu Thr Leu Gly Leu Ile Trp Asn Ile Ile Leu His Trp Gln Val	120
Lys Asn Val Met Lys Asn Ile Met Ala Gly Leu Gln Gln Thr Asn	135
Ser Glu Lys Ile Leu Leu Ser Trp Val Arg Gln Ser Thr Arg Asn	150
Tyr Pro Gln Val Asn Val Ile Asn Phe Thr Thr Ser Trp Ser Asp	165
Gly Leu Ala Leu Asn Ala Leu Ile His Ser His Arg Pro Asp Leu	180
Phe Asp Trp Asn Ser Val Val Cys Gln Gln Ser Ala Thr Gln Arg	195
Leu Glu His Ala Phe Asn Ile Ala Arg Tyr Gln Leu Gly Ile Glu	210
Lys Leu Leu Asp Pro Glu Asp Val Asp Thr Thr Tyr Pro Asp Lys	225
Lys Ser Ile Leu Met Tyr Ile Thr Ser Leu Phe Gln Val Leu Pro	240
Gln Gln Val Ser Ile Glu Ala Ile Gln Glu Val Glu Ala His Arg	255
Asp Phe Gly Pro Ala Ser Gln His Phe Leu Ser Thr Ser Val Gln	270
Gly Pro Trp Glu Arg Ala Ile Ser Pro Asn Lys Val Pro Tyr Tyr	285
Ile Asn His Glu Thr Gln Thr Thr Cys Trp Asp His Pro Lys Met	300
Thr Glu Leu Tyr Gln Ser Leu Ala Asp Leu Asn Asn Val Arg Phe	315
Ser Ala Tyr Arg Thr Ala Met Lys Leu Arg Arg Leu Gln Lys Ala	330
Leu Cys Leu Asp Leu Leu Ser Leu Ser Ala Ala Cys Asp Ala Leu	345
Asp Gln His Asn Leu Lys Gln Asn Asp Gln Pro Met Asp Ile Leu	360
Gln Ile Ile Asn Cys Leu Thr Thr Ile Tyr Asp Arg Leu Glu Gln	375
Glu His Asn Asn Leu Val Asn Val Pro Leu Cys Val Asp Met Cys	390
Leu Asn Trp Leu Leu Asn Val Tyr Asp Thr Gly Arg Thr Gly Arg	405
Ile Arg Val Leu Ser Phe Lys Thr Gly Ile Ile Ser Leu Cys Lys	420
Ala His Leu Glu Asp Lys Tyr Arg Tyr Leu Phe Lys Gln Val Ala	435
Ser Ser Thr Gly Phe Cys Asp Gln Arg Arg Leu Gly Leu Leu Leu	450
His Asp Ser Ile Gln Ile Pro Arg Gln Leu Gly Glu Val Ala Ser	465
Phe Gly Gly Ser Asn Ile Glu Pro Ser Val Arg Ser Cys Phe Gln	480
Phe Ala Asn Asn Lys Pro Glu Ile Glu Ala Ala Leu Phe Leu Asp	495
Trp Met Arg Leu Glu Pro Gln Ser Met Val Trp Leu Pro Val Leu	510
His Arg Val Ala Ala Ala Glu Thr Ala Lys His Gln Ala Lys Cys	525
Asn Ile Cys Lys Glu Cys Pro Ile Ile Gly Phe Arg Tyr Arg Ser	540
Leu Lys His Phe Asn Tyr Asp Ile Cys Gln Ser Cys Phe Phe Ser	555
Gly Arg Val Ala Lys Gly His Lys Met His Tyr Pro Met Val Glu	570
Tyr Cys Thr Pro Thr Thr Ser Gly Glu Asp Val Arg Asp Phe Ala	585
Lys Val Leu Lys Asn Lys Phe Arg Thr Lys Arg Tyr Phe Ala Lys	600
His Pro Arg Met Gly Tyr Leu Pro Val Gln Thr Val Leu Glu Gly	615
Asp Asn Met Glu Thr Pro Val Thr Leu Ile Asn Phe Trp Pro Val	630
Asp Ser Ala Pro Ala Ser Ser Pro Gln Leu Ser His Asp Asp Thr	645
His Ser Arg Ile Glu His Tyr Ala Ser Arg Leu Ala Glu Met Glu	660

63

Asn Ser Asn Gly Ser Tyr Leu Asn Asp Ser Ile Ser Pro Asn Glu  
 Ser Ile Asp Asp Glu His Leu Leu Ile Gln His Tyr Cys Gln Ser  
 Leu Asn Gln Asp Ser Pro Leu Ser Gln Pro Arg Ser Pro Ala Gln  
 Ile Leu Ile Ser Leu Glu Ser Glu Glu Arg Gly Glu Leu Glu Arg  
 Ile Leu Ala Asp Leu Glu Glu Asn Arg Asn Leu Gln Ala Glu  
 Tyr Asp Arg Leu Lys Gln Gln His Glu His Lys Gly Leu Ser Pro  
 Leu Pro Ser Pro Pro Glu Met Met Pro Thr Ser Pro Gln Ser Pro  
 Arg Asp Ala Glu Leu Ile Ala Glu Ala Lys Leu Leu Arg Gln His  
 Lys Gly Arg Leu Glu Ala Arg Met Gln Ile Leu Glu Asp His Asn  
 Lys Gln Leu Glu Ser Gln Leu His Arg Leu Arg Gln Leu Leu Glu  
 Gln Pro Gln Ala Ala Lys Val Asn Gly Thr Thr Val Ser Ser  
 Pro Ser Thr Ser Leu Gln Arg Ser Asp Ser Ser Gln Pro Met Leu  
 Leu Arg Val Val Gly Ser Gln Thr Ser Asp Ser Met Gly Glu Glu  
 Asp Leu Leu Ser Pro Pro Gln Asp Thr Ser Thr Gly Leu Glu Glu  
 Val Met Glu Gln Leu Asn Asn Ser Phe Pro Ser Ser Arg Gly Arg  
 Asn Thr Pro Gly Lys Pro Met Arg Glu Asp Thr Met \*\*\*

675  
 690  
 705  
 720  
 735  
 750  
 765  
 780  
 795  
 810  
 825  
 840  
 855  
 870  
 885  
 897

## 【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、様々な数のロッド・リピートを持つ短縮型ジストロフィン遺伝子の構築をしめたものである。図1のAは、ヒト全長型ジストロフィン遺伝子、ミニジストロフィン遺伝子及び新しく作製した短縮型ジストロフィンcDNAの一覧を示したものである。図1のBは、ΔDysAX2 (AX2), ΔDysAX (AX11), ΔDysAH3 (AH3) 及びΔDysM3 (M3) における再構築したロッド・リピートのアミノ酸配列を示したものである。図1のCは、ΔDysH1 (H1) 及びΔDysH4 (H4) における連結領域の\*

\*アミノ酸配列を示すものである。

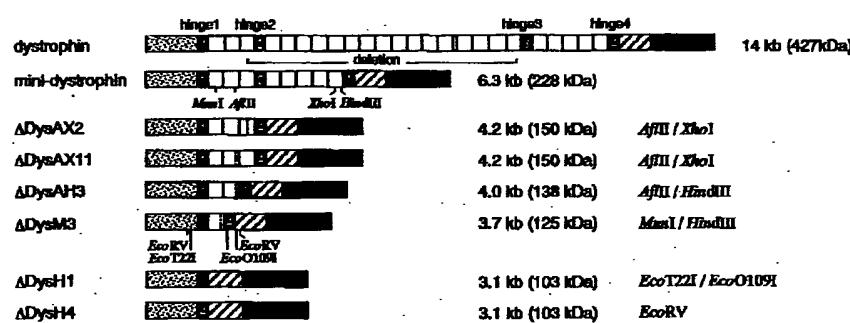
【図2】図2は、アデノウイルスベクターを用いた短縮型ジストロフィンcDNAのマウス骨格筋細胞株への導入の結果を示すものである。

【図3】図3は、アデノウイルスベクターを用いた短縮型ジストロフィンcDNAのm d xマウスの骨格筋への導入を示す図面に代わる写真である。

【図4】図4は、Ax CAAΔDysM3を注射したm d x骨格筋の形質膜におけるジストロフィン結合蛋白質の回復を示す図面に代わる写真である。

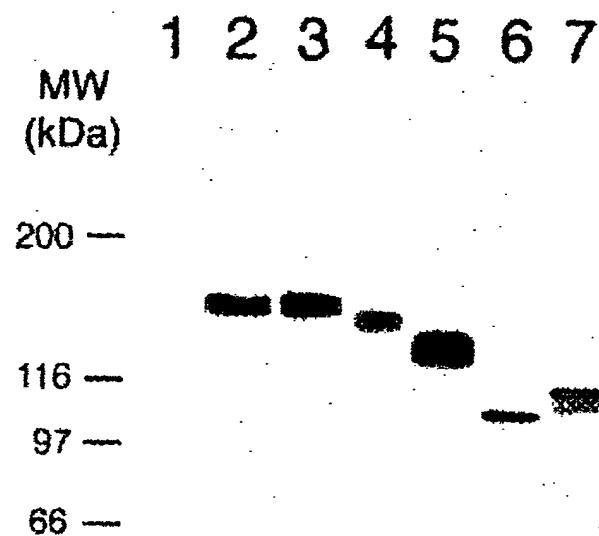
## 【図1】

▶



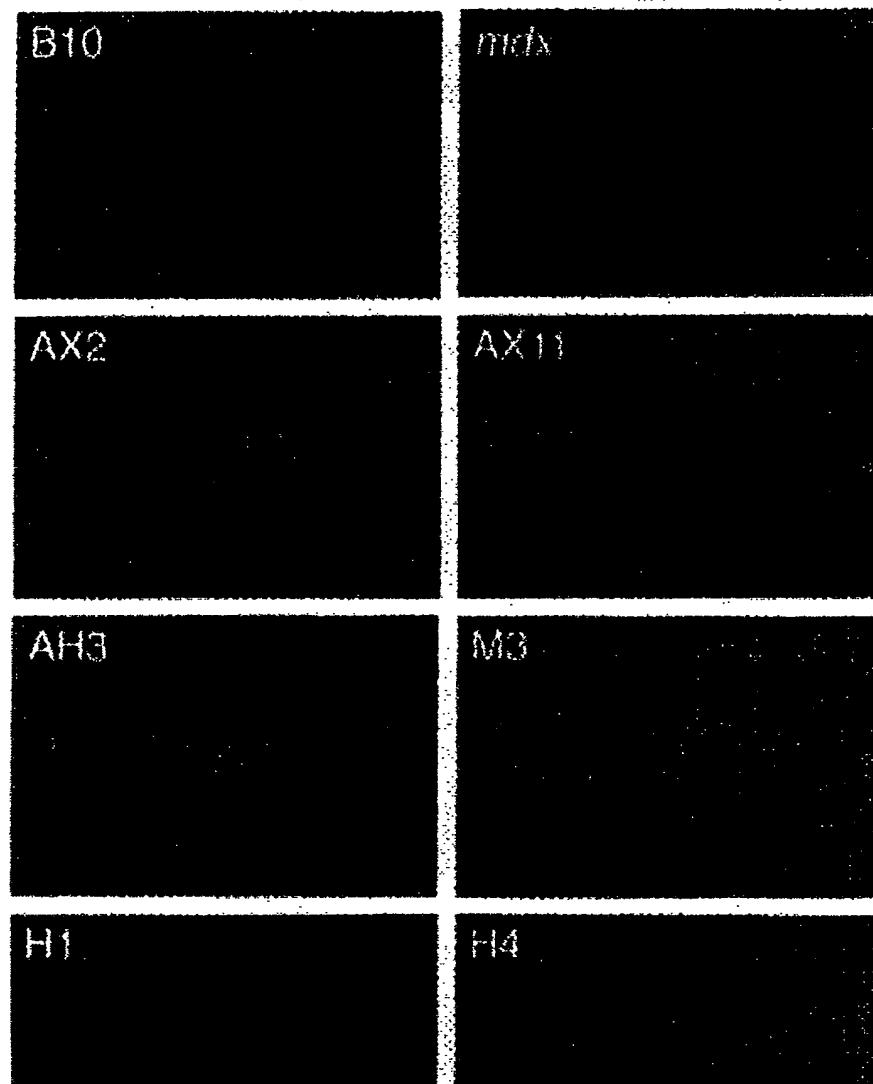
【図2】

図面代用写真



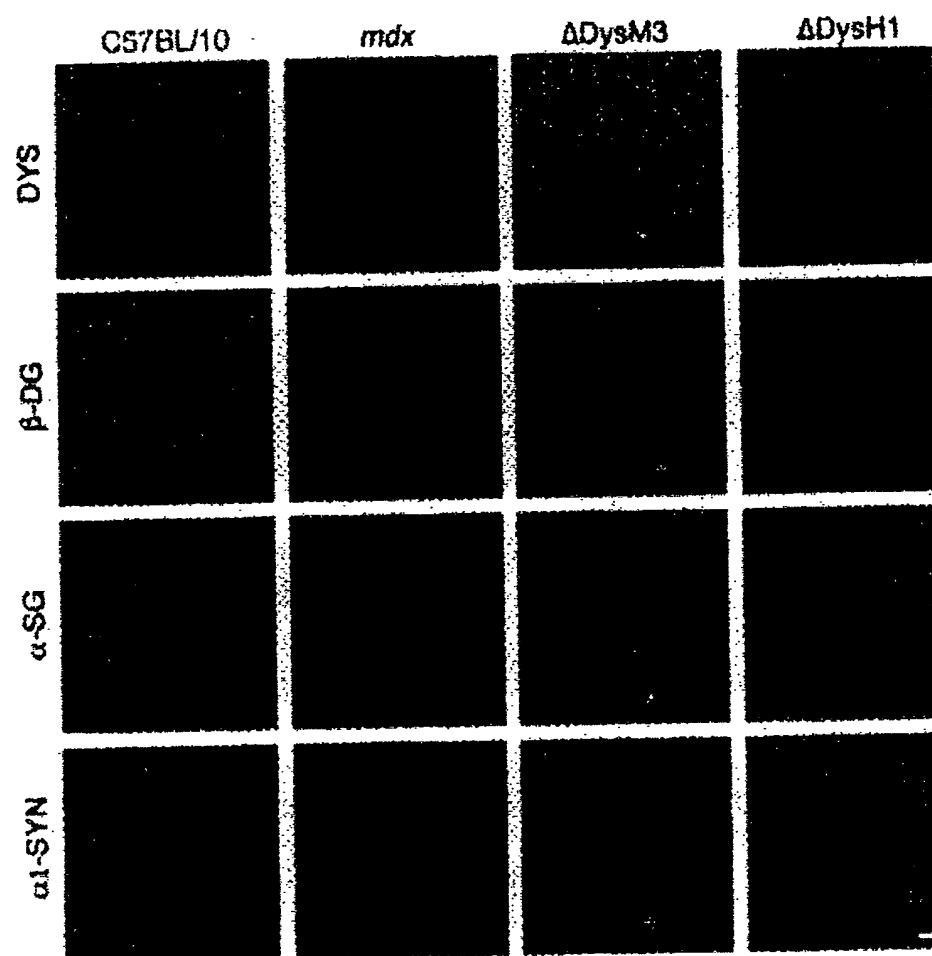
【図3】

図面代用写真



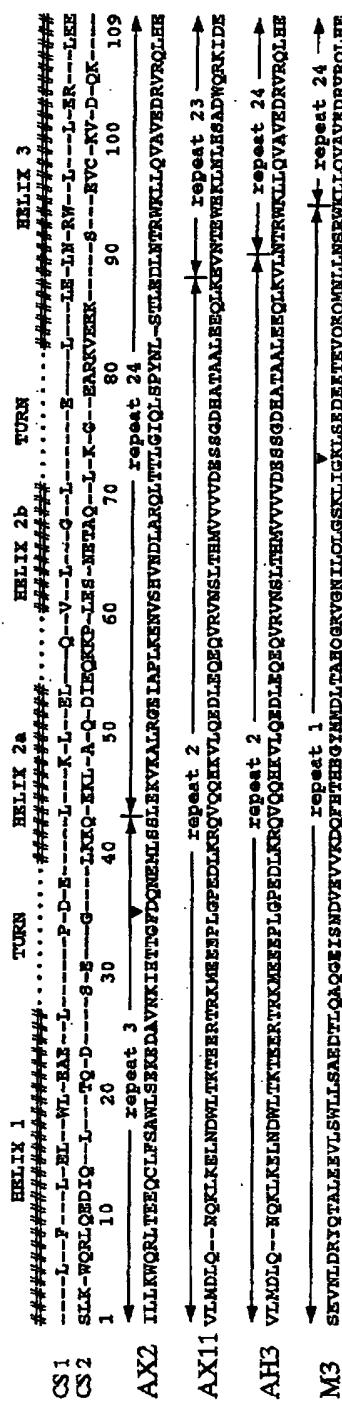
【図4】

図面代用写真



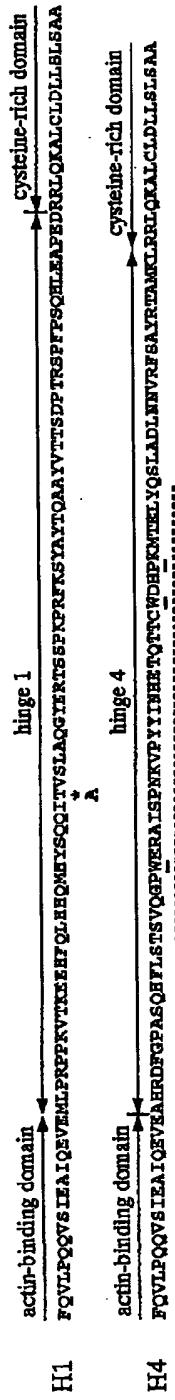
【図1】

B



【図1】

C



## 【手続補正書】

【提出日】平成10年7月21日

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0019

## 【補正方法】変更

## 【補正内容】

【0019】全長型ジストロフィン遺伝子は、N末端よりアクチン結合ドメイン、ロッド・ドメイン、システイン・リッチ・ドメイン、そして、C末端ドメインをコードしている。本発明者らは、8個のロッド・リピートを持つヒトミニ・ジストロフィン遺伝子(6.3kb)を材料にして、ロッド・ドメインを更に短縮した6種類のロッド短縮型ジストロフィンcDNAを構築した(図1)。全ての構築物は、N末のアクチン結合ドメイン、システイン・リッチ・ドメイン、そして、C末端ドメインを残している。

## 【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0020

## 【補正方法】変更

## 【補正内容】

【0020】デザインされた $\Delta$ Dy<sub>s</sub>AX2, AX11, AH3及びM3は、それぞれ、3個、3個、2個、1個のロッド・リピートとヒンジ1とヒンジ4の両方を持っている。これらの4つの短縮型ジストロフィンにおいて、融合部分でロッドリピートの推定トリプルヘリカル構造(ケニヒラ、ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー、265巻、4560-4566頁(1990年) [Koenig, M. and Kunkele, L. M. (1990) J. Biol. Chem. 265, 4560-4566.])を維持するようにcDNAをデザインした(図5)。一方、 $\Delta$ Dy<sub>s</sub>H1及びH4は、ロッド・リピートは全く持たず、それぞれ、ヒンジ1か4のどちらかを持っている(図1、図6)。これらのcDNAの構築のために使用したプライマーやオリゴヌクレオチドの塩基配列は、後述する実施例1の表1に示されている。

## 【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0023

## 【補正方法】変更

## 【補正内容】

【0023】得られたプラスミドpBSBMDとプライマーF1/R1(表1参照)またはF2/R2(表1参照)で増幅したPCR断片を、Af1II/XhoIで切断した後、pBSBMDのAf1II/XhoI部位に挿入し、それぞれ、pBS $\Delta$ Dy<sub>s</sub>AX2またはpBS $\Delta$ Dy<sub>s</sub>AX11を作製した。次に、鋳型のpBSBMDとプライマーF4/R4(表1参照)で増幅したP

CR産物をMunI/HindIIIで切断した後、pBSBMDのMunI/HindIII部位に挿入し、pBS $\Delta$ Dy<sub>s</sub>M3を作製した。続いて、オリゴヌクレオチドF3/R3(表1参照)のアニーリングにより作製した断片を、pBSBMDのAf1II/HindIII部位の連結に使用し、pBS $\Delta$ Dy<sub>s</sub>AH3を作製した。これらの挿入断片は、連結した際、ロッド・リピートのトリプル・ヘリカル構造を維持するようにデザインした。連結したロッド・リピートのアミノ酸配列を図5に示す。

## 【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0024

## 【補正方法】変更

## 【補正内容】

【0024】この結果、 $\Delta$ Dy<sub>s</sub>AX2, AX11, AH3及びM3は、N末端のアクチン結合ドメイン、システイン・リッチ・ドメインとC末端ドメインを保持し、更にそれぞれ3個、3個、2個、1個のロッド・リピートとヒンジ1と4の両方を持つ。 $\Delta$ Dy<sub>s</sub>H1と $\Delta$ Dy<sub>s</sub>H4のcDNAをもつ2個のプラスミドは、pBS $\Delta$ Dy<sub>s</sub>M3(図1)から作製した。1個のEcoO109I部位を除くために、pBS $\Delta$ Dy<sub>s</sub>M3をApaIで切断し、平滑化後、セルフライゲーションさせ、pBS $\Delta$ Dy<sub>s</sub>M3bを作製した。鋳型のpBS $\Delta$ Dy<sub>s</sub>M3とプライマーF5/R5(表1参照)を使って増幅したPCR産物をEcoT22I/EcoO109Iで切断した後、これをpBS $\Delta$ Dy<sub>s</sub>M3bのEcoT22I/EcoO109I部位に挿入し、pBS $\Delta$ Dy<sub>s</sub>H1を作製した。

## 【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0025

## 【補正方法】変更

## 【補正内容】

【0025】pBS $\Delta$ Dy<sub>s</sub>H4の作製のために、pBS $\Delta$ Dy<sub>s</sub>M3を鋳型とし、プライマーF5/R6(表1参照)あるいはF6/R7(表1参照)を使って2種類のPCR反応を別個に行った。得られた2種類のPCR産物の混合物を鋳型として、プライマーF5/R7(表1参照)を使って2回目のPCR反応を行った。得られた断片をEcoRVで切断した後、これをpBS $\Delta$ Dy<sub>s</sub>M3中の2個のEcoRV部位の間に挿入した。連結領域のアミノ酸配列を図6に示す。得られた $\Delta$ Dy<sub>s</sub>H1及びH4は、ロッド・リピートは全く持たず、それぞれ、ヒンジ1か4のどちらかを持つ(図1)。

## 【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0026

## 【補正方法】変更

## 【補正内容】

【0026】図1、図5及び図6は、様々な数のロッド・リピートを持つ短縮型ジストロフィン遺伝子の構築を示したものである。図1は、ヒト全長型ジストロフィン遺伝子、ミニジストロフィン遺伝子及び新しく作製した短縮型ジストロフィンcDNAの一覧図である。ΔDysAX2, ΔDysAX, ΔDysAH3及びΔDysM3を構築するために、ミニジストロフィンcDNAの中央部のロッド・ドメインをそれぞれの構築物の右側に示した制限酵素で切断した。ロッド・リピート構造を再構築するために、PCR増幅断片あるいは合成DNA断片を使って得られた両末端を連結させた。ΔDysH1及びΔDysH4を構築するために、ΔDysM3を図示した制限酵素で切断後、PCR増幅断片を使って両末端を連結した。点線は連結部を示す。cDNAのサイズと短縮型ジストロフィンの推定分子量を右側に示す。アクチン結合ドメインを点々のボックスで、ロッド・ドメインを白抜きのボックスで（それぞれのリピートを1個のボックスで示す）、システイン・リッチ・ドメインを斜線の入ったボックスで、そして、C末端ドメインは陰を付けたボックスで図示する。黒色のボックスはヒンジを示す。ヒンジの記載はM. KoenigとL. M. Kunke1の記述に従った。

## 【手続補正7】

## 【補正対象書類名】明細書

## 【補正対象項目名】0027

## 【補正方法】変更

## 【補正内容】

【0027】図5は、ΔDysAX2 (AX2), ΔDysAX11 (AX11), ΔDysAH3 (AH3) 及びΔDysM3 (M3) における再構築したロッド・リピートのアミノ酸配列を示す。縦線は連結部位を示す。三角形と点線は、ロッド・リピートの整列を最適化するためのギャップと欠失の位置を示す (M. KoenigとL. M. Kunke1による)。CS1とCS2はジストロフィンの24個のリピートのコンセンサス配列を示す。CS1は、24個のリピートのうち少なくとも8個のリピートの中に見つかったアミノ酸を、CS2は5、6あるいは7個のリピートに見られるアミノ酸を示す。

## 【手続補正8】

## 【補正対象書類名】明細書

## 【補正対象項目名】0028

## 【補正方法】変更

## 【補正内容】

【0028】図6は、ΔDysH1 (H1) 及びΔDysH4 (H4) における連結領域のアミノ酸配列ΔDysH1 (H1) では、ヒンジ1はシステイン・リッチ・ドメインに直結する。ΔDysH4 (H4) では、アク

チン結合ドメインはヒンジ4に直結する。ヒンジ1にあるチロシン (T) (星印) は、北アメリカのXLCMの家系でアラニン (A) に変異していた。ヒンジ4の下の点線はWWドメインを示す；WWドメインのうち、最も保存されたアミノ酸を下線で示す。

## 【手続補正9】

## 【補正対象書類名】明細書

## 【補正対象項目名】0062

## 【補正方法】変更

## 【補正内容】

【0062】実施例1（ロッド短縮型ジストロフィン遺伝子の構築）

以下に示す方法を用いて、ロッド・ドメインをさらに短縮したジストロフィン遺伝子を6種類構築した（図1参照）。最初に、ヒトミニ・ジストロフィンcDNA (アスカディラ、ネイチャー、352巻、615-818頁 (1991年) [Acsadi, G., Dickson, G., Love, D. R., Jani, A., Walsh, F. S., Gurusinghe, A., Wolff, T. A., and Davies, K. E. (1991) *Nature* 352, 815-818.]) である6.3kbのNotI/SalI断片をpBluescriptII (SK+) (Stratagene) のNotI/SalI部位に挿入してpBSBMDを作製した。次に、AX2, AX11, AH3, M3と名付けた短縮型ジストロフィン (ΔDys) のcDNAを持つ4つのプラスミドを以下に示すように作製した。cDNAの構築のために使用されたプライマーやオリゴヌクレオチドの塩基配列を、表1に示す。

## 【手続補正10】

## 【補正対象書類名】明細書

## 【補正対象項目名】0065

## 【補正方法】変更

## 【補正内容】

【0065】一方、ΔDysH1とΔDysH4のcDNAをもつ2個のプラスミドは、pBSΔDysM3 (図1参照) から作製した。まず、EcoO109I部位を一つ除くために、pBSΔDysM3をApaIで切断、平滑化後、セルフライゲーションさせ pBSΔDysM3bとした。鋳型のpBSΔDysM3と、プライマーF5/R5を使って増幅したPCR産物を、EcoT22I/EcoO109Iで切断した後、pBSΔDysM3bのEcoT22I/EcoO109I部位に挿入し、pBSΔDysH1を作製した。pBSΔDysH4の作製のためには、2種類のPCR反応を、pBSΔDysM3を鋳型として、プライマーF5/R6あるいはF6/R7を使って別個に行った。得られた2種類のPCR産物の混合物を鋳型として、プライマーF5/R7を使って2回目のPCR反応を行った。得られた断片をEcoRVで切断した後、これをpBSΔDy

s M 3 中の 2 個の E c o R V 部位の間に挿入した。連結領域のアミノ酸配列を図 5 と図 6 に示す。

【手続補正 11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図面の簡単な説明

【補正方法】変更

【補正内容】

【図面の簡単な説明】

【図 1】図 1 は、様々な数のロッド・リピートを持つ短縮型ジストロフィン遺伝子の構築をしめたものである。図 1 は、ヒト全長型ジストロフィン遺伝子、ミニジストロフィン遺伝子及び新しく作製した短縮型ジストロフィン c DNA の一覧を示したものである。

【図 2】図 2 は、アデノウイルスベクターを用いた短縮型ジストロフィン c DNA のマウス骨格筋細胞株への導入の結果を示すものである。

【図 3】図 3 は、アデノウイルスベクターを用いた短縮型ジストロフィン c DNA の m d x マウスの骨格筋への導入を示す図面に代わる写真である。

【図 4】図 4 は、A x C A Δ D y s M 3 を注射した m d x 骨格筋の形質膜におけるジストロフィン結合蛋白質の回復を示す図面に代わる写真である。

【図 5】図 5 は、様々な数のロッド・リピートを持つ短縮型ジストロフィン遺伝子の構築のうちの、Δ D y s A X 2 (AX 2)、Δ D y s A X (AX 11)、Δ D y s A H 3 (AH 3) 及び Δ D y s M 3 (M 3) における再構築したロッド・リピートのアミノ酸配列を示したものである。

【図 6】図 6 は、様々な数のロッド・リピートを持つ短縮型ジストロフィン遺伝子の構築のうちの、Δ D y s H 1 (H 1) 及び Δ D y s H 4 (H 4) における連結領域のアミノ酸配列を示すものである。

【手続補正 12】

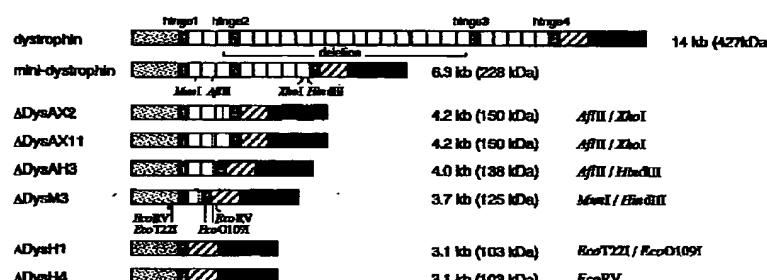
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】全図

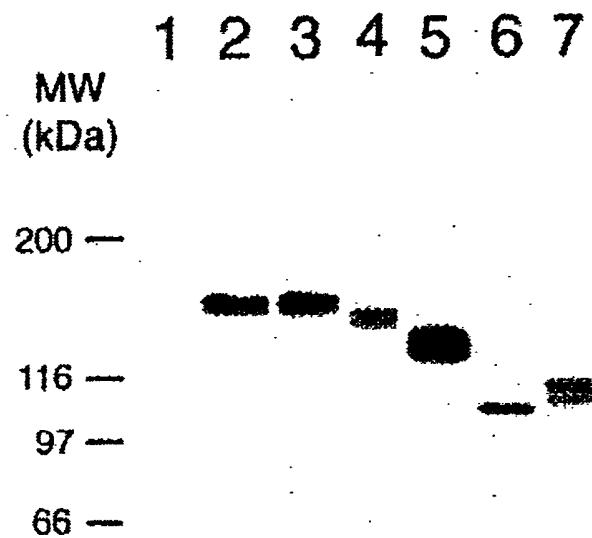
【補正方法】変更

【補正内容】

【図 1】

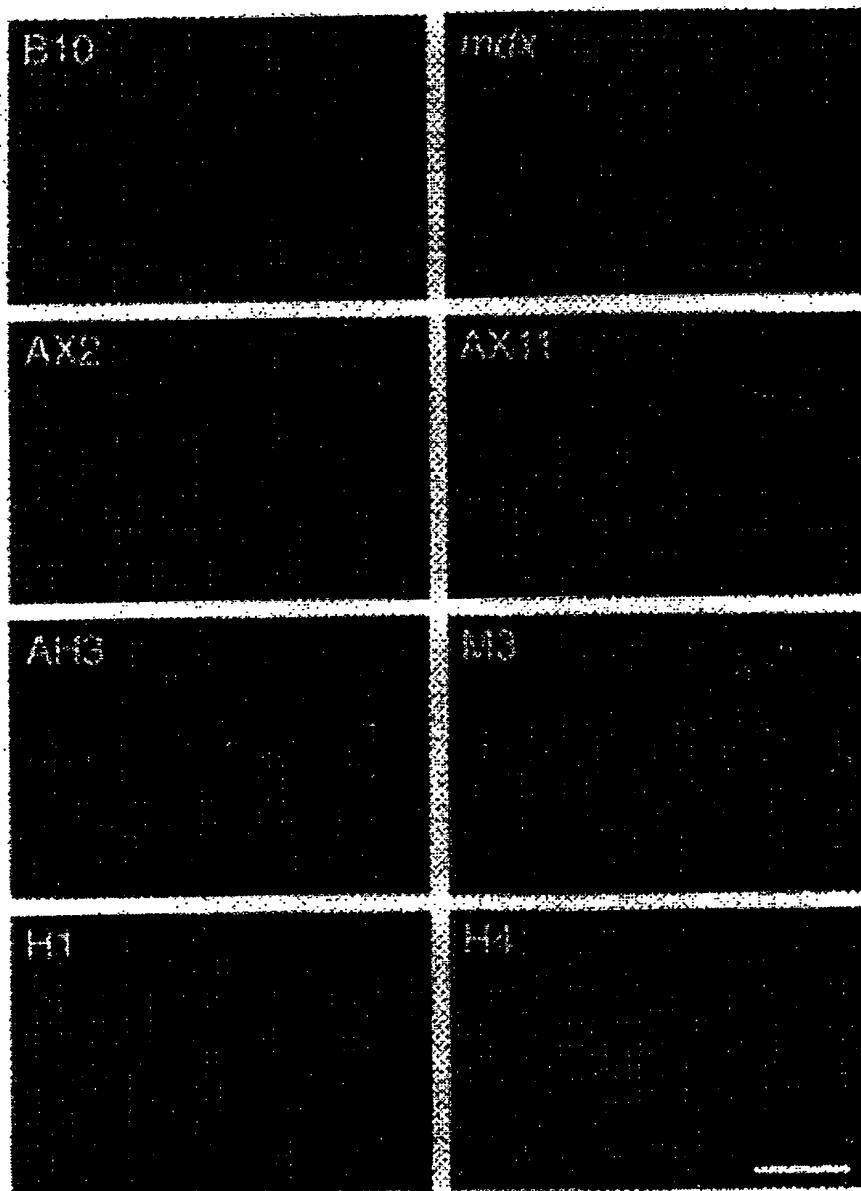


【図2】



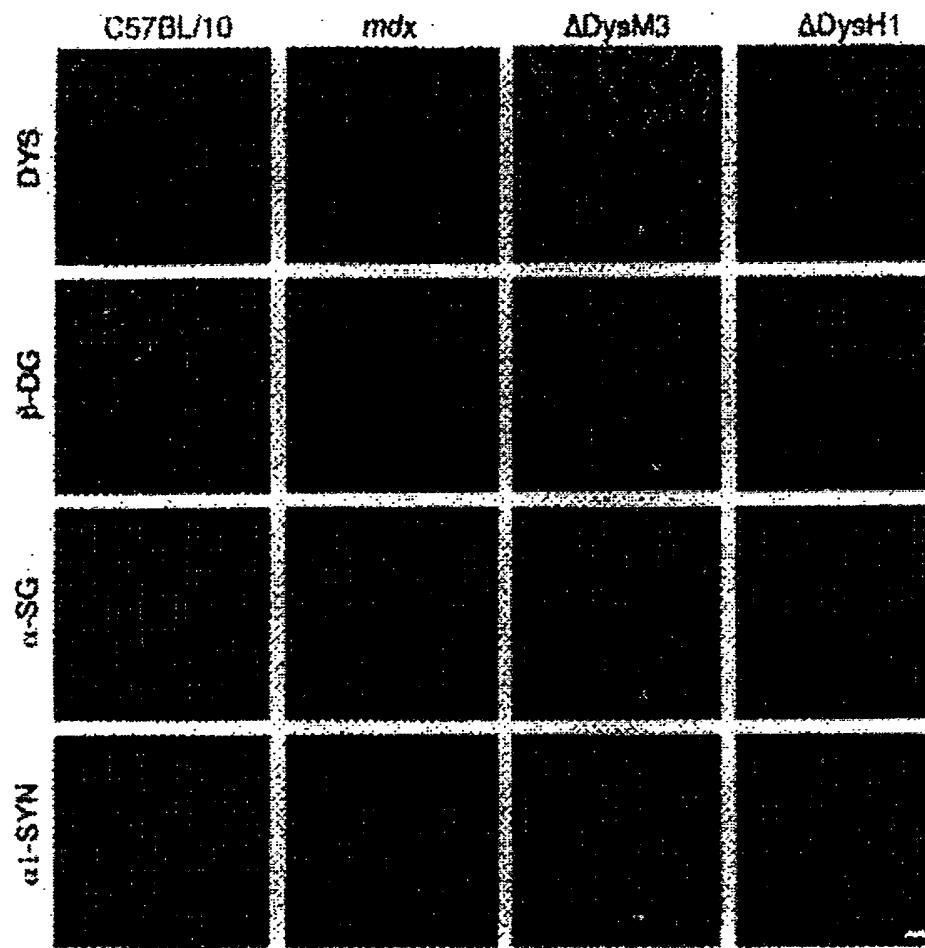
図面代用写真

【図3】



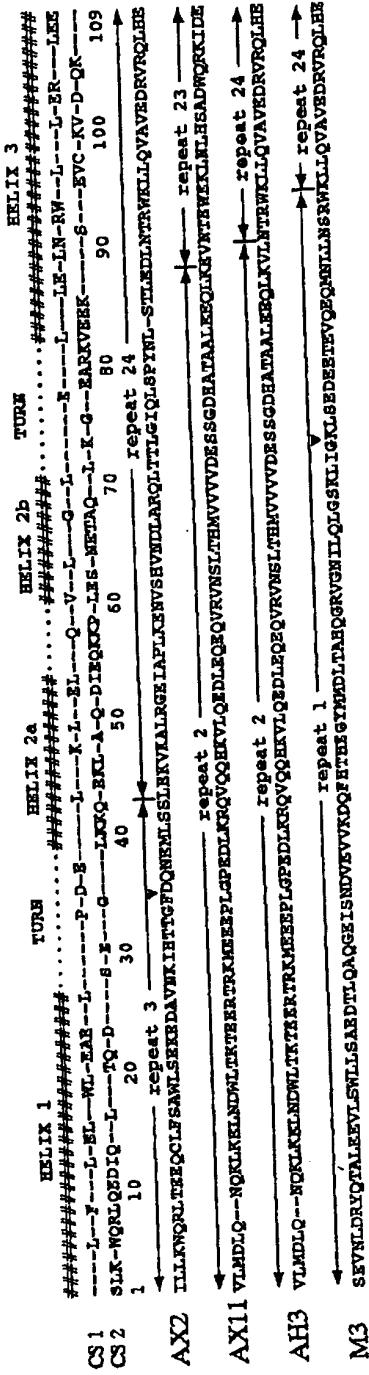
図面代用写真

【図4】



図面代用写真

【図5】



【図6】

